

KARINA SCURUPA MACHADO

DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NA BACIA DO ALTO IGUAÇÚ,
REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA-PR

CURITIBA
2010

KARINA SCURUPA MACHADO

DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NA BACIA DO ALTO IGUAÇÚ,
REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA-PR

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Engenharia de Recursos
Hídricos e Ambiental da Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do grau de mestre

Orientador: Prof Dr Julio César R. Azevedo.
Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Cristina
Borba Braga.

CURITIBA
2010

Machado, Karina Scurupa

Determinação de hormônios sexuais femininos na bacia do Alto Iguaçu, região metropolitana de Curitiba-PR / Karina Scurupa Machado - Curitiba, 2010.

102 f. : il., tabs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental.

Orientador: Julio Cesar R. Azevedo

Co-orientadora: Maria Cristina Borba Braga

1. Hormônios sexuais. 2. Água – Poluição. 3. Limnologia. 4. Bacias hidrográficas. 5. Esgotos. I. Azevedo, Júlio Cesar R. II. Braga, Maria Cristina Borba. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 551.483



TERMO DE APROVAÇÃO

KARINA SCURUPA MACHADO

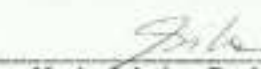
"Determinação de Hormônios Sexuais Femininos na Bacia do alto Rio Iguaçu, Região Metropolitana de Curitiba-PR"

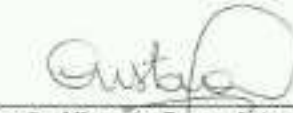
Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

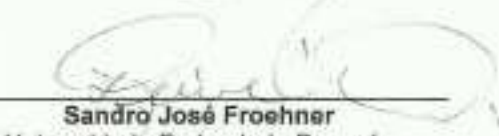
PRESIDENTE:



Júlio César Rodrigues de Azevedo
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Orientador

MEMBROS:


Maria Cristina Borba Braga
Universidade Federal do Paraná
Co-orientadora


Cristovão Vicente Scapulatempo Fernandes
Universidade Federal do Paraná


Sandro José Froehner
Universidade Federal do Paraná


Arion Zandoná Filho
Universidade Tuiuti do Paraná

Curitiba, 23 de abril de 2010

“Para que os nossos interesses não sejam os únicos, mas haja respeito por outras formas de vida e pelas gerações futuras”.

Autor Desconhecido

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar comigo em todos os momentos. Sem Ele não seria possível completar esta importante etapa da minha vida.

Ao meu orientador, o prof. Dr. Julio Cesar e Co-orientadora Dra Cristina Braga, pelo apoio e paciência durante os percalços da dissertação.

Ao LABEAM, pela disponibilidade de material e estrutura laboratorial para a realização dos ensaios e desenvolvimento da pesquisa.

A minha família e, em especial, ao meu esposo Hamilton pelo apoio incondicional e irrestrito durante o desenvolvimento dos estudos.

Aos meus amigos do DHS e da UTFPR Heloise, Carla, Vanessa, Luiz, Felipe, Marcel, Daniel Detzel, Fernanda, dentre outros, pelos momentos de descontração, auxílio e ajuda na construção dos resultados deste trabalho.

À minha querida amiga Nicole pela sua preciosa amizade, companheirismo e fidelidade durante todo o período do mestrado.

Aos professores Cristóvão e Miguel do DHS pelas dúvidas sanadas.

Ao prof Sandro pelos equipamentos e reagentes disponibilizados.

À Marlize do IPPUC pela dedicação e prestatividade no fornecimento de dados e informações pertinentes ao trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram no processo produtivo para o desenvolvimento e conclusão da pesquisa. Muito Obrigada.

RESUMO

Hormônios Sexuais Femininos (HSFs) são compostos que representam uma ameaça à biota aquática e ao ser humano em baixas concentrações, causando interferência diretamente no sistema endócrino. O consumo de anticoncepcionais e a excreção natural por seres humanos e alguns vertebrados conferem estabilidade a estes compostos, quando lançados continuamente ao meio ambiente, por meio de efluentes domésticos. A área selecionada para o estudo foi a bacia do Alto Iguaçu, Região Metropolitana de Curitiba-PR, que apresenta particularidades em relação ao uso e ocupação do solo. Em relação à determinação de HSFs, a maioria dos estudos na literatura utiliza a detecção por espectrometria de massas. No entanto, os métodos desenvolvidos neste trabalho, utilizam o detector de arranjo de diodos e resultam em ferramentas analíticas de menor custo e maior facilidade na utilização. Para garantir a eficiência, os métodos analíticos foram validados de acordo com os parâmetros determinados pela ANVISA e INMETRO e apresentaram-se efetivos na determinação de HSFs nas matrizes de água superficial e sedimento. Os métodos foram então aplicados na análise quantitativa de amostras coletadas no período entre fevereiro a outubro de 2009, em um total de cinco campanhas amostrais. Como resultados foram observadas concentrações de HSFs na água superficial, quando detectadas, na faixa de 0,07 a 13,45 µg/L e no sedimento na faixa de 3,04 a 137,91 µg/kg, concentrações estas, superiores aos valores encontrados na literatura. O motivo se deve, provavelmente ao nível de contaminação por efluentes domésticos na região estudada e aumento progressivo no consumo de anticoncepcionais no Brasil. Entre os rios monitorados os rios Iguaçu e Atuba foram os que apresentaram as maiores concentrações de HSFs, tanto na água como no sedimento, devido, provavelmente, à característica de confluência do ponto localizado no rio Iguaçu, com todos os pontos amostrados e à proximidade com a ETE Atuba Sul. Em relação ao coeficiente de partição sedimento/água (K_d) dos HSFs na região estudada, foram observados valores de 1,54 a 536 L/kg, sendo os maiores valores obtidos para a progesterona, caracterizando maior afinidade deste hormônio pelo sedimento e menor mobilidade no meio ambiente, quando comparado aos estrogênios que apresentaram valores mais baixos de K_d e são, portanto, mais facilmente transportados nos corpos hídricos. Os valores observados para K_{oc} variaram de 1,93 a 4,68 L/kg e seguiram a sequência PG>E1>E2>EET indicando, maiores forças de adsorção para o PG e E1. Em relação à ETE Atuba Sul, considerando o afluente e efluente, foram observadas diminuições na concentração de alguns hormônios e aumento na concentração de outros. Isso se deve, provavelmente, a conversões entre os hormônios, desconjugação de formas inativas em formas ativas após entrada na ETE e a transferência para o lodo. Considerando a escassez de dados referentes à contaminação de recursos hídricos por HSFs, no estado do Paraná, o objetivo principal deste estudo foi obter dados representativos e confiáveis das concentrações de HSFs durante o tratamento na ETE Atuba Sul e em matrizes de água superficial e sedimento.

Palavras chaves: Hormônios sexuais femininos, limnologia, coeficiente de partição, tratamento anaeróbio de esgoto doméstico.

ABSTRACT

Female Sexual Hormones (FSHs) are compounds that represent a threat to aquatic organisms and human being even in low concentrations, by causing a direct interference in the endocrine system. Contraceptive consumption and natural excretion by people and other vertebrates give these compounds stability, because of their continuous input in the environment through domestic sewage. The area chosen for this study was the Upper Iguaçu basin, Metropolitan Region of Curitiba – PR, which shows some particularities in relation to land use and occupation. Regarding FSHs determination, most studies found in literature use mass spectrometry detection. However, the method applied in this work uses a diode array detector, which implies in a less expensive and easier to use tool. To guarantee efficiency, analytical methods were validated according to the parameters established by ANVISA and INMETRO, and showed themselves effective in determination of FSHs in water and sediment samples. The methods were then applied to quantitative analysis of samples collected in a period between February and October 2009, in a total of five sampling campaigns. The results showed FSHs concentrations in superficial water, when detected, from 0.07 to 13.45µg/L and in sediment samples from 3.04 to 137.91µg/L, higher values than those found in literature. These high values are probably due to a progressive raise in the level of contamination of water bodies with domestic effluents in the studied region and due to a raise in contraceptive consumption in Brazil as well. Among the monitored Rivers, Iguaçu and Atuba were those that showed the highest concentrations of FSHs, in water and sediment samples, probably because of the confluence of Iguaçu sampling point and all other sampling points and also because of the proximity to Atuba Sul Sewage Treatment Station (STS). In relation to the FSHs sediment/water partition coefficient (K_d) in the studied area, values from 1.54 to 536L/Kg were observed, with the highest values found to progesterone, characterizing a greater affinity of this hormone with the sediment and therefore its lower mobility in the environment. The estrogens showed lower K_d values, meaning that they are more easily transported in water bodies. The observed values of K_{oc} varied from 1.93 to 4.68L/Kg and followed the sequence $PG > E1 > E2 > EET$, indicating greater adsorption strengths to PG and E1. Regarding Atuba Sul STS, considering affluent and effluent, it was observed that some hormones decreased and others increased. This is probably due to conversion between hormones, deconjugation of inactive forms to active forms after the entrance in STS and transference to the sludge. Considering the scarcity of data regarding water resources contamination with FSHs in the State of Paraná, the main goal of this study was to obtain trustable and representative data on the FSHs concentrations during the sewage treatment in Atuba Sul STS and in superficial water and sediment samples

Keywords: female sex hormones, limnology, partition coefficient, anaerobic treatment of domestic sewage.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA BÁSICA DOS ESTERÓIDES.....	04
FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO DE LIGAÇÃO DO 17 β -ESTRADIOL (E2) COM O RECEPTOR HUMANO. HIS = HISTIDINA; GLU = GLICINA; ARG = ARGININA.....	05
FIGURA 3 – BIOSÍNTESE DO HORMÔNIO 17 β -ESTRADIOL A PARTIR DO COLESTEROL.....	07
FIGURA 4 – ESQUEMA DE DEGRADAÇÃO DO 17 β -ESTRADIOL E ESTRONA POR MICROORGANISMOS E POR FOTOCATÁLISE COM TiO ₂	13
FIGURA 5 – PROVÁVEL ROTA DOS HSFs NO MEIO AMBIENTE.....	14
FIGURA 6 – ESTRUTURA MOLECULAR DOS QUATRO HSFs ESTUDADOS.....	19
FIGURA 7 – ESQUEMA DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE MOLÉCULAS ATIVAS DE ESTROGÊNIOS A PARTIR DE MOLÉCULAS INATIVAS E CONJUGADOS.....	19
FIGURA 8 – ESQUEMA DA PARTE SUPERIOR DA BACIA DO ALTÍSSIMO IGUAÇU COM A LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS AMOSTRADOS.....	28
FIGURA 9 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DO PROCESSO DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR REATOR ANAERÓBIO COM MANTA DE LODO.....	29
FIGURA 10 – MAPA COM A LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS AMOSTRADOS, SENDO AT: RIO ATUBA, IG: RIO IGUAÇU, IT: RIO ITAQUI, CP: CANAL PARALELO.....	30
FIGURA 11 – GRADIENTES DE FASE MÓVEL, TESTADOS.....	32
FIGURA 12 – CARTUCHO EMPREGADO NA EFS	33
FIGURA 13 – FASES DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	33
FIGURA 14 – ETAPAS DO CONDICIONAMENTO DE SÍLICA GEL LIGADA A OCTADESILCILANO (C18), SEM CONDICIONAMENTO (A), PARCIALMENTE CONDICIONADO (B), TOTALMENTE CONDICIONADO (C).....	34
FIGURA 15 – SISTEMA UTILIZADO PARA A EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE HSFs EM MATRIZES DE ÁGUAS SUPERFICIAIS.....	36
FIGURA 16 – LOCAL DE AMOSTRAGEM NO PONTO IG-01.....	43
FIGURA 17 – LOCAL DE AMOSTRAGEM NO PONTO AT-01.....	44
FIGURA 18 – LOCAL DE AMOSTRAGEM NO PONTO AT-02.....	44
FIGURA 19 – LOCAL DE AMOSTRAGEM NO PONTO AT-03.....	45
FIGURA 20 – LOCAL DE AMOSTRAGEM NO PONTO IT-01.....	45
FIGURA 21 – LOCAL DE AMOSTRAGEM NO PONTO CP-01.....	46
FIGURA 22 – LOCAL DE AMOSTRAGEM NO PONTO IG-02.....	46
FIGURA 23 – GRADIENTES E PROPORÇÕES DE FASE MÓVEL TESTADOS NA OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS HSFs (λ :200nm, FLUXO:1mL/min).....	49
FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA EM 3 DIMENSÕES DO COMPRIMENTO DE ONDA, TEMPO DE RETENÇÃO E INTENSIDADE DE ABSORBÂNCIA NO ULTRAVIOLETA, REFERENTE À AMOSTRA COLETADA EM OUT/09 NO PONTO AT-03.....	50

FIGURA 25 – CROMATOGRAMAS GERADOS NA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DE HSFs EM ÁGUA SUPERFICIAIS.....	53
FIGURA 26 – CROMATOGRAMAS GERADOS NA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DE HSFs EM SEDIMENTO.....	54
FIGURA 27 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DE UM DOS ESTROGÊNIOS (E2) E DA PROGESTERONA, PRESENTES NA SÇ PADRÃO, EM ÁGUA SUPERFICIAL E EM SEDIMENTO.....	55
FIGURA 28 – CURVAS ANALÍTICAS DOS QUATRO HSFs PESQUISADOS ILUSTRANDO A SENSIBILIDADE DE CADA UM.....	56
FIGURA 29 – REPETIBILIDADE DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA UMA SOLUÇÃO PADRÃO DE 5000 mg/L DOS QUATRO HSFs PESQUISADOS, EXPRESSA POR MEIO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV) PARA UM NÚMERO DE 6 REPETIÇÕES REALIZADAS EM UM MESMO DIA (REPETITIVIDADE) E EM DIAS DIFERENTES (PRECISÃO INTERMEDIÁRIA).....	57
FIGURA 30 – LIMITES GEOGRÁFICOS DE MUNICÍPIOS LINDEIROS À ÁREA DE ESTUDO COM SUAS RESPECTIVAS PORCENTAGENS DE COLETA DE ESGOTO.....	61
FIGURA 31 – VARIAÇÃO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE COD (mg/L) NOS PONTOS MONITORADOS.....	63
FIGURA 32 – VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA NAS AMOSTRAS DO PONTO À JUSANTE DA ETE ATUBA SUL.....	65
FIGURA 33 – ESPECTROS SINCRONIZADOS ($\Delta\lambda$:18nm) DO RIO ATUBA (AT-01 E AT-03), RIO IGUAÇU (IG-02), RIO ITAQUI (IT-01), CANAL EXTRAVASOR (CP-01) E DA ENTRADA DA ESTAÇÃO DE ESGOTOS DA ETE-ATUBA SUL (ETE), DA COLETA 3 (JUN/09).....	66
FIGURA 34 – VARIAÇÃO DAS CARGAS DE HSFs NOS PONTOS MONITORADOS, DURANTE O PERÍODO DE FEV/09-OUT/09	72
FIGURA 35 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE E2 ($\mu\text{g/L}$) E OD (mg/L) E SUA RELAÇÃO COM A VAZÃO (m^3/s) DO RIO IGUAÇÚ, NO PERÍODO ESTUDADO (FEV/09-OUT/09).....	74
FIGURA 36 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE N.AMONIACAL E NITRATO (mg/L) E SUA RELAÇÃO COM A VAZÃO (m^3/s) DO RIO IGUAÇÚ, NO PERÍODO ESTUDADO (FEV/09-OUT/09).....	75
FIGURA 37 – EXEMPLO DE GALERIA CONTENDO ESGOTO DOMÉSTICO, AO LONGO DO CANAL EXTRAVASOR.....	78
FIGURA 38 – VALORES MÉDIOS DE K_d DOS ESTROGÊNIOS NOS RIOS ATUBA, IGUAÇÚ E CANAL EXTRAVASOR.....	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EXCREÇÃO DIÁRIA (μg) DE 17 β -ESTRADIOL, ESTRONA, ESTRIO E 17 α -ETINILESTRADIOL, POR SERES HUMANOS.....	11
TABELA 2 – ALGUMAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HSFs PESQUISADOS.....	20
TABELA 3 – NÚMERO DO CAS, MARCA, PUREZA E NOME IUPAC DOS COMPOSTOS PESQUISADOS.....	31
TABELA 4 – PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS TESTADOS PARA EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE HSFs EM MATRIZ DE ÁGUA SUPERFICIAIS.....	35
TABELA 5 – PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS TESTADOS PARA EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE HSFs EM MATRIZ DE SEDIMENTO.....	37
TABELA 6 – PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA CONFORMIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	52
TABELA 7 – FAIXAS DE APLICAÇÃO UTILIZADAS NA ANÁLISE DE HSFs EM ÁGUA SUPERFICIAL E SEDIMENTO.....	52
TABELA 8 – RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DOS QUATRO HSFs ESTUDADOS EM MATRIZES DE ÁGUA SUPERFICIAL, SEDIMENTO E LODO ANAERÓBIO.....	58
TABELA 9 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HSFs NO EQUIPAMENTO (CLAE) E DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE CADA MATRIZ.....	59
TABELA 10 – VALORES MÉDIOS DAS VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS:.....	60
TABELA 11 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS RELAÇÕES DE ABSORBÂNCIA, INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA E CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO (COD) NOS PONTOS MONITORADOS.....	65
TABELA 12 – CONCENTRAÇÃO DE HSFS ($\mu\text{g/L}$) NAS AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL DO RIO IGUAÇÚ (IG), ATUBA (AT), ITAQUI (IT) E CANAL EXTRAVASOR (CP).....	69
TABELA 13 – CONCENTRAÇÃO DOS HSFS (ng/L) EM ÁGUA SUPERFICIAL, OBTIDAS POR DIVERSOS AUTORES.....	70
TABELA 14. CARGAS DE HSFs (kg/dia) OBSERVADAS NOS PONTOS MONITORADOS DURANTE O PERÍODO ESTUDADO (FEV/09-OUT/09).....	71
TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO DOS HSFs ($\mu\text{g/kg}$) NAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO DOS RIO IGUAÇÚ (IG), ATUBA (AT), ITAQUI (IT) E CANAL EXTRAVASOR (CP).....	79
TABELA 16 – VALORES DE HSFs EM SEDIMENTO ($\mu\text{g/kg}$) OBSERVADOS NA LITERATURA.....	80
TABELA 17 – CONCENTRAÇÃO DE HSFS NO AFLUENTE E EFLUENTE DA ETE ATUBA SUL, DE ESTROGÊNIOS APÓS O TRATAMENTO ANAERÓBIO E RESPECTIVAS REDUÇÕES E INCREMENTOS NOS VALORES OBSERVADOS.....	84

LISTA DE SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVIATURAS

A ₂₈₅	- Absortividade em 285 nm em L/mg.m
ACN	- Solvente orgânico Acetonitrila
AIQA	- Avaliação do Índice de Qualidade de Água
C18	- Octadecilsilano
CELSAM	- Comitê Científico do Centro Latino Americano Saúde e Mulher
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Resolução
COD	- Carbono Orgânico Dissolvido
COT	- Carbono Orgânico Total
CV	- Coeficiente de Variação
DAD	- Detector com Ânodo de Diodos
DCM	- Solvente Orgânico Diclorometano
DES	- Dietilbestrol
E1	- Estrona
E2	- 17 β -Estradiol
EET	- 17 α -Etinilestradiol
EFS	- Extração em Fase Sólida
ETE	- Estação de Tratamento de Esgoto
FE	- Fase Estacionária
FM	- Fase Móvel
GARP	- Grupo de Analistas de Resíduo de Pesticidas
HCL	- Ácido Clorídrico
HSFs	- Hormônios Sexuais Femininos
IAP	- Instituto Ambiental do Paraná
IPPUC	- Instituto de Pesquisa e Planejamento Urbano de Curitiba
JEA	- Agência Ambiental do Japão
K _d	- Coeficiente de Partição Sedimento/Água
K _g	- Quilo
K _{oc}	- Coeficiente de Partição Sedimento/Água normalizado pelo COT
K _{ow}	- Coeficiente de Partição Octanol/Água
L	- Litro
LD	- Limite de Detecção
Log	- Logarítimo
LQ	- Limite de Quantificação
N	- Nitrogênio
ng	- Nanogramas
nm	- Nanômetros
OSPAR	- Comissão de Paris e Oslo
PG	- Progesterona
pH	- Potencial Hidrogeniônico

PW	- Comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência
RF	- Razão entre intensidades de fluorescência
rpm	- Rotações por minuto
Sç	- Solução
SUVA ₂₅₄	- Absortividade a 254 nm em L/mg.m normalizada pelo COD
TiO ₂	- Dióxido de Titânio
UK	- Agência Ambiental do Reino Unido
USEPA	- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV	- Ultravioleta
λ	- Comprimento de onda
μg	- Microgramas

SUMARIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vi
1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1 – OBJETIVOS.....	03
1.1.1 – OBJETIVO GERAL.....	03
1.1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	03
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 – HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS - HSFs.....	04
2.1.1 – Metabolismo.....	06
2.1.2 – Fontes e Excreção.....	09
2.1.3 – Mecanismos de Degradação e Transporte no Meio Ambiente.....	11
2.1.4 – Remoção dos HSFs nas ETEs.....	14
2.1.5 – Efeitos Nocivos ao Meio Ambiente.....	16
2.1.6 – Estrutura Molecular e Propriedades Físico-Químicas.....	18
2.2 – DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	21
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 – CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	25
3.2 – OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS DE HSFs.....	30
3.2.1 – Separação Cromatográfica.....	31
3.2.2 – Extração, Purificação e Concentração dos Analitos.....	32
3.3 – VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
3.4 – OUTRAS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	41
3.5 – CAMPANHAS AMOSTRAIS.....	42
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
4.1 – ADAPTAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	48
4.2 – VALIDAÇÃO.....	51
4.3 – CAMPANHAS AMOSTRAIS.....	59
4.3.1 – Avaliação da Qualidade da Água.....	59
4.3.2 – Hormônios Sexuais Femininos no Meio Ambiente (Água Sedimento).....	67
4.3.3 – Hormônios Sexuais Femininos na ETE Atuba Sul.....	83
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
5.1 – CONCLUSÕES.....	88
5.2 – RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....	90
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1.0 INTRODUÇÃO

Atualmente, problemas ambientais causados pelo crescimento populacional, tem sido uma grande preocupação, tanto para as autoridades governamentais, como para a própria sociedade. O crescimento constante das cidades, sem devido controle, acarreta na degradação dos recursos naturais básicos, dentre eles, a água.

Para conter o crescimento populacional, o uso de anticoncepcionais representa uma das alternativas mais utilizadas, pois ao proporcionar um controle eficaz da contracepção, trouxe à sociedade um avanço significativo, na medida em que facilitou a emancipação da mulher e sua participação no mercado de trabalho, permitindo às famílias, mediante planejamento, a adequação entre número de filhos e suas condições econômicas.

Segundo o Comitê Científico do Centro Latinoamericano Saúde e Mulher – CELSAM, O Brasil encontra-se em terceiro lugar no consumo de anticoncepcionais na América Latina, atrás somente do Uruguai e do Chile (Pershe, 2008).

Entretanto, esta evolução promovida pelo uso dos anticoncepcionais, tem se tornado uma preocupação, mediante as condições de saneamento em que a maioria dos países se encontra, pois os hormônios provenientes dos anticoncepcionais, denominados, hormônios sexuais femininos (HSFs), não são eficientemente removidos nas ETEs, e quando dispersos no meio ambiente, principalmente por meio do lançamento de esgoto, os HSFs, mesmo em baixas concentrações, na faixa de ng e µg, possuem potencial para causar diversos problemas ambientais, tanto para a fauna aquática, como para o ser humano.

A toxicidade dos HSFs tem sido reportada por diversas organizações como a Agência de Proteção Ambiental dos EUA – USEPA, a Agência Ambiental do Reino Unido – UK, a Agência Ambiental do Japão – JEA e a Comissão de Paris e Oslo – OSPAR, onde fazem parte de um grupo de compostos denominados poluentes emergentes.

Apesar das concentrações destes hormônios, encontradas no meio ambiente, serem aparentemente baixas, podem ser consideradas elevadas, quando comparadas à concentração mínima de 10ng/L, capaz de causar efeito biológico em organismos aquáticos.

No Brasil, diversos estudos envolvendo a determinação de HSFs em matrizes ambientais foram realizados nos últimos 10 anos. No entanto, nenhum destes estudos foi realizado no estado do Paraná, demonstrando, assim, a carência de dados na literatura que descrevam as condições dos corpos hídricos deste estado, quanto à presença de HSFs.

Dessa forma, a determinação de HSFs em matrizes ambientais no estado do Paraná poderá contribuir com a elucidação de uma nova preocupação em relação à gestão de recursos hídricos no estado, pois são compostos nocivos ao meio ambiente, mesmo em baixas concentrações. Considerando as grandes quantidades em que os HSFs são

lançados no meio ambiente, diariamente, percebe-se a importância do monitoramento da concentração destes compostos e de outras características como mobilidade, que pode ser avaliada por meio de coeficientes de partição e distribuição (K_{ow} , K_d e K_{oc}), principais meios de transporte, mecanismos de degradação e fontes, com a finalidade de promover melhorias no tratamento de esgoto, capazes de remover HSFs, de forma eficiente.

Um dos principais desafios no monitoramento de HSFs em matrizes ambientais é a dificuldade em encontrar métodos analíticos confiáveis, principalmente devido às baixas concentrações em que se encontram no meio ambiente.

Atualmente, entre os métodos de análise mais utilizados, as cromatografias gasosa, e líquida de alta eficiência, em conjunto com a espectrometria de massa, têm sido as técnicas mais utilizadas na separação, identificação e quantificação de HSFs. No entanto, trata-se de equipamentos que apresentam custo elevado e requerem mão de obra qualificada, impossibilitando assim, o acesso a estes equipamentos, por muitas instituições de pesquisa. Desta forma, a disponibilização de métodos analíticos confiáveis, utilizando equipamentos de menor custo e maior facilidade na operação, atua como um estímulo à pesquisa de HSFs, ampliando o campo de atuação de diversas instituições e contribuindo para o desenvolvimento científico na região, pois embora não contemplados na legislação, os HSFs apresentam características nocivas ao meio ambiente e requerem atenção por parte da sociedade e comunidade científica.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade das águas superficiais de alguns ambientes da Bacia do Alto Iguaçu por meio da determinação de suas características limnológicas e das concentrações de Hormônios Sexuais Femininos (HSFs), na coluna d'água e no sedimento.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar e validar métodos analíticos para extração, concentração e quantificação dos HSFs: 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinilestradiol, Estrona e Progesterona, em água superficial e sedimento.
- Determinar a concentração de HSFs em água superficial e sedimento da bacia do Alto Iguaçu.
- Calcular os coeficientes de partição sedimento/água, K_d , e o normalizado pelo carbono orgânico total, K_{oc} , visando avaliar a mobilidade dos HSFs no meio ambiente e a força de adsorção à fração sólida.
- Estimar a eficiência de remoção de HSFs em uma Estação de Tratamento de Efluentes, com amostragens do esgoto afluente e efluente.
- Divulgar o problema envolvendo a presença de HSFs no ambiente, em especial no Estado do Paraná, que apresenta carência de informações sobre o assunto.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS – HSFs

Quimicamente, os hormônios são proteínas derivadas de aminoácidos ou esteróides. Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), os esteróides compreendem uma classe de hormônios cuja estrutura básica é formada pelo ciclo[a]fenantreno (Figura 01). Nessa estrutura podem existir ligações duplas, metilas, carbonilas e hidroxilas, dando origem a uma série de hormônios esteroidais (RAIMUNDO, 2007).

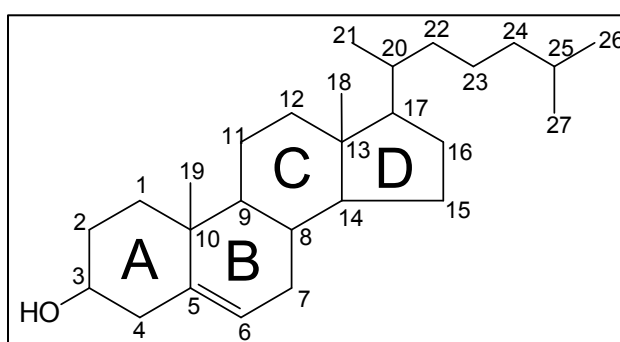


FIGURA 01 - ESTRUTURA BÁSICA DOS ESTERÓIDES

FONTE: KASSAB (2001)

Os hormônios estão envolvidos na reprodução sexual tanto de homens quanto de mulheres e agem como uma espécie de mensageiros químicos, promovendo a comunicação entre diferentes partes do organismo (FALONE, 2007). As células identificam os hormônios por meio de receptores que são estruturas protéicas especializadas no reconhecimento molecular. Após a aproximação e interação hormônio-receptor, uma série de reações bioquímicas ocorre levando às respostas biológicas específicas. Trata-se de uma espécie de mecanismo de chave e fechadura em que para cada hormônio há um receptor que o reconhece, o hormônio então se encaixa para ser absorvido e agir no local específico (SIMMONDS, 1992, VEDRAMI, 1998).

A Figura 02 apresenta um esquema de ligação entre um hormônio (17 β - Estradiol) com seu respectivo receptor humano. O anel aromático, denominado A, é o responsável pela transmissão da informação biológica por meio da realização de ligações de hidrogênio com o receptor humano (OKHO *et al.*, 2002).

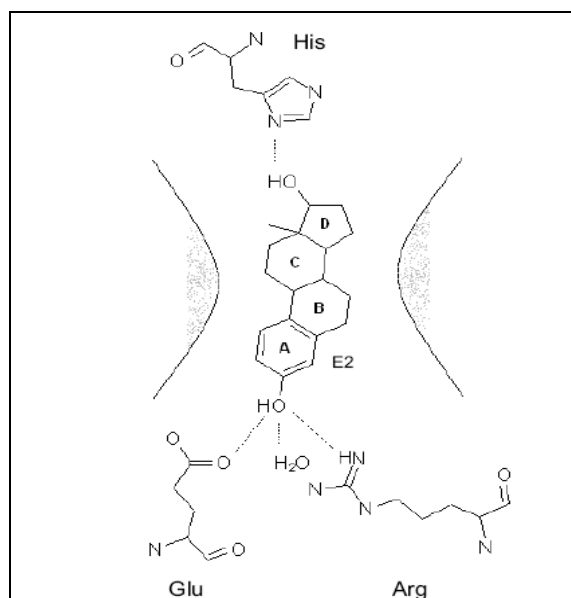


FIGURA 02 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO DE LIGAÇÃO DO 17 β -ESTRADIOL (E2) COM O RECEPTOR HUMANO. HIS = HISTADINA; GLU = GLICINA; ARG = ARGININA

FONTE: OKHO *et al.* (2002)

Entretanto, algumas substâncias podem, por exemplo, imitar a ação dos hormônios naturais levando o organismo a desencadear, de modo exagerado ou em tempo inapropriado, a um estímulo falso, cujo fenômeno é designado por efeito agonista (COLUCCI, BORK E TOPP, 2001). Outras substâncias podem bloquear os receptores específicos a um determinado hormônio endógeno, reduzindo ou anulando os estímulos em certas partes do organismo que, normalmente, são sensíveis, sendo este fenômeno determinado por efeito antagonista (BIBBO *et al.*, 1978, JOLLY *et al.*, 2006). Estes compostos são denominados disruptores endócrinos e são caracterizados por serem substâncias químicas capazes de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos (GHISELLI, 2007). Os principais fatores que influenciam o modo de atuação dos disruptores endócrinos no organismo relacionam-se com a natureza, a concentração e tipo de interação. Também são importantes o tempo de exposição, os fatores genéticos, a especificidade dos tecidos, a idade e o sexo, entre outros. A alteração ou desregulação da função endócrina pode estar associada à interferências na síntese, secreção, transporte, ligação e ação ou eliminação de hormônios naturais do organismo, o que conduz a uma nova resposta hormonal, fraca ou forte, que resulta em um sinal inexistente para o organismo (FORSTMEIER, 2005; ARAUJO, 2006).

As consequências mais severas relacionadas aos disruptores endócrinos podem não ocorrer nos organismos por meio do contato direto, mas pela transferência da mãe para o feto (efeito teratogênico), causando anomalias reprodutivas ou mudanças que podem

provocar um desenvolvimento desordenado de células na prole, podendo induzir ao câncer (BAIRD, 2002; FORSTMEIER, 2005).

As substâncias capazes de interferir no sistema endócrino podem atuar, alterando o desenvolvimento, reprodução e funções de diversas espécies a ela expostos, principalmente em espécies que possuem semelhança, como é o caso dos vertebrados que são semelhantes tanto na forma quanto na função hormonal e nos vegetais que embora tenham outras estruturas e outras funções, o mecanismo pelo qual eles atuam é semelhante (JOLLY *et al.*, 2006; FALONE, 2007). Estas substâncias capazes de alterar o sistema endócrino constituem basicamente duas classes de compostos:

(1) os hormônios naturais que incluem o estrogênio, a progesterona e a testosterona, presentes no corpo humano e nos animais, e os fitoestrogênios, compostos presentes em algumas plantas, como nas sementes de soja, e que apresentam uma atividade semelhante aos esteróides hormonais quando ingeridos por um determinado organismo (VENDRAMI, 1998);

(2) os compostos sintéticos ou de origem antrópica que incluem os hormônios sintéticos que são hormônios idênticos aos naturais, fabricados pelo homem e utilizados como contraceptivos orais e/ou aditivos na alimentação animal, bem como os xenoestrogênios, produzidos para a utilização nas indústrias e na agricultura (INADERA, 2006). Estão incluídos nesta categoria os pesticidas e aditivos plásticos (ftalatos), compostos de organoestanho, alquilfenóis, as bifenilas policloradas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, retardantes de chama (éteres difenílicos polibromados) e ainda subprodutos de processos industriais, como as dioxinas e furano (COLUCCI, BORK E TOPP, 2001; KIRK *et al.*, 2003; GHISELLI, 2006).

Entre os hormônios femininos, os estrogênios naturais 17 β -Estradiol, Estrona e Estriol, o estrogênio sintético 17 α -Etinilestradiol e a progesterona, conhecidos como hormônios sexuais femininos (HSFs) são os que despertam maior preocupação ambiental, tanto pela potência quanto pela quantidade continuamente introduzida no meio ambiente. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas. Sua ação biológica no sistema endócrino é agonista, ou seja, mimetiza, imita a ação dos hormônios naturais (GHISELLI, 2006; JOLLY *et al.*, 2006). Assim, são considerados um problema ambiental, sendo os responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados no meio-ambiente (ARAÚJO, 2006).

2.1.1 METABOLISMO

Os estrogênios são definidos como uma família de hormônios esteróides responsáveis pelo desenvolvimento das características secundárias femininas no início da

puberdade. Agem no controle da ovulação, no desenvolvimento e preparo cíclico do sistema reprodutor para a fertilização e implantação do óvulo, no aumento das glândulas mamárias durante a gravidez, estimulam o crescimento dos tecidos ao promover a proliferação celular nos órgãos sexuais femininos (seios e útero), além de exercerem influência sobre o crescimento, desenvolvimento e o comportamento (NASSIF *et al.*, 2005; CHAMPE *et al.*, 2006). Atuam também nos sistemas imunológico e cardiovascular além de influir na pele, nos ossos, no fígado e mesmo no cérebro, assegurando a normalidade nos sistemas orgânicos (RAIMUNDO, 2007).

A síntese dos estrogênios naturais ocorre, principalmente, nos ovários a partir da androstenediona ou testosterona como precursores imediatos e nos testículos. Pode ocorrer também localmente em tecidos não endócrinos, tais como o fígado, o tecido adiposo e o cérebro, por meio da conversão do hormônio masculino testosterona em 17 β -Estradiol, sob a ação da enzima conversora aromatase, conforme apresentado na Figura 03 (KASSAB, 2001).

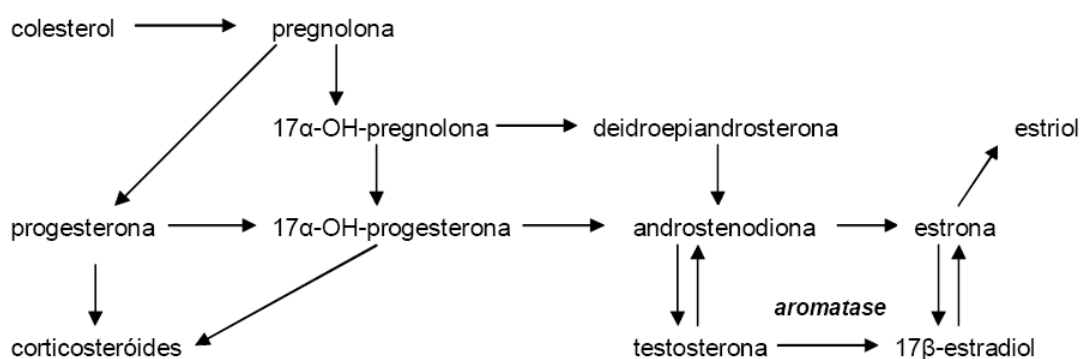


FIGURA 03 - BIOSÍNTESE DO HORMÔNIO 17 β -ESTRADIOL A PARTIR DO COLESTEROL

FONTE: ÖSTERLUND, M.K. E HURD, Y.L. (2001), Adaptado por RAIMUNDO (2007)

O estrogênio mais abundante e potente de ocorrência natural nos seres humanos é o 17 β -Estradiol, seguido pela Estrona e Estriol, principal forma de excreção do hormônio. O 17 β -Estradiol é doze vezes mais ativo que a Estrona e oitenta vezes mais do que o Estriol, sendo extremamente ativo biologicamente. Nos organismos superiores, a Estrona é produzida como um metabólito do 17 β -Estradiol (COLUCCI, BORK E TOPP, 2001; KASSAB, 2001; GILMAM *et al.*, 2003).

Sinteticamente, os estrogênios produzidos possuem sua estrutura molecular modificada. Em geral são mais potentes que os estrogênios naturais e consequentemente mais ativos. Atuam no sistema endócrino e alteram a atividade fisiológica, mesmo em baixas concentrações. O estrogênio sintético mais consumido é o 17 α -Ethinilestradiol, produzido a

partir do 17 β -Estradiol, sendo largamente utilizado em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos (KHANAL, 2006). Apresenta um agrupamento etinila no carbono 17 (Figura 04) que o protege contra a inativação pelo fígado (KASSAB, 2001).

O dietilestilbestrol (DES) foi um dos primeiros estrogênios não-esteróides a serem sintetizados. Apresenta estrutura química semelhante a do 17 β -Estradiol, quando na conformação *trans*. O DES é tão potente quanto o 17 β -Estradiol. É ativo por via oral e apresenta meia vida mais longa comparado a este, no organismo. Atualmente seu uso é restrito, mas foi importante historicamente, pois foi introduzido como estrogênio ativo por via oral, em uma época em que produtos naturais eram escassos. Este hormônio foi considerado como medicamento para terapia endócrina eficaz. Porém, seu potencial carcinogênico restringiu seu uso (KASSAB, 2001).

Em relação aos progestagênios estes são hormônios que ajudam a regular as mudanças que ocorrem durante a menstruação e a gestação, sendo conhecidos por hormônios da gravidez (CHAMPE *et al.*, 2006). A progesterona, principal representante do grupo dos progestagênios, é produzida naturalmente pelo organismo humano (SIAH *et al.*, 2003; LA MORA *et al.*, 2007). Suas principais funções biológicas são a preparação, juntamente com os estrogênios, do útero para a implantação do ovo fertilizado, proliferação do endométrio, e a manutenção do embrião implantado (WIJAYAGUNAWARDANE, MIYAMOTO e SATO, 1998).

A progesterona é o progestagênio mais importante nos seres humanos. Além dos seus efeitos hormonais essenciais, a progesterona atua como precursor de androgênios e esteróides córtico-supra-renais. Na mulher, não grávida, normalmente a progesterona é produzida em quantidades significativas, após a segunda metade de cada ciclo ovariano, quando é secretada pelo corpo lúteo. Durante esta fase, os níveis plasmáticos variam de 0,5 a mais de 2,0 $\mu\text{g/dL}$ (GOLDEFIEN, 1995). Pequenas quantidades também são secretadas pelos testículos e pelo córtex adrenal em ambos os sexos. Na gravidez, a placenta também sintetiza e libera grande quantidade de progesterona, especialmente durante o quarto mês de gestação. Caso não haja gravidez, as concentrações plasmáticas de progesterona caem e levam à descamação do revestimento endometrial e, a menstruação ocorre (KASSAB, 2001).

Na ausência da progesterona, a gestação torna-se impossível, pois não ocorre implantação do embrião no útero ou o embrião é abortado, por outro lado, a gestação também não ocorre quando grandes doses de progesterona são reintroduzidas (ROSEN *et al.*, 1995). O resultados de estudos realizados por La Mora *et al.*, (2007) mostram que a progesterona age também no ovário, regulando o ciclo ovariano pela inibição da emergência de um novo folículo via seu efeito intraovariano. O efeito inibitório da progesterona no crescimento folicular tem sido utilizado na composição de progestogênios unicamente

contraceptivos, onde sua administração resulta na supressão do crescimento folicular e inibição da ovulação (VENDRAMI, 1998).

Todos os progestagênios sintéticos são derivados da 17 α -hidroxiprogesterona, isolada em 1940 das glândulas adrenais, ou da 19 nortestosterona. Atualmente, somente derivados da 19-nortestosterona são utilizados nas preparações de contraceptivos orais (VENDRAMI, 1998). Entre os progestagênios sintéticos mais utilizados, estão o norgestinato, desogestrel e gestodeno que possuem ação similar à progesterona e estão presentes nas formulações das pílulas anticoncepcionais além de medicamentos usados em tratamentos de infertilidades, endometrioses e controle de câncer de mama (KASSAB, 2001).

2.1.2 FONTES E EXCREÇÃO

No meio ambiente, a principal fonte de contaminação por HSFs é o lançamento de esgoto sem tratamento e a ineficiência das ETEs, seguido da pecuária (RAMAN *et al.*, 2004; ZHENG, YATES E BRADFORD 2008). As grandes quantidades de HSFs presentes no esgoto são provenientes, principalmente, da excreção feminina advinda da produção natural e do consumo de anticoncepcionais orais e injetáveis (PONEZI, DUARTE E CLAUDINO, 2006). Em mulheres normais, o 17 β -Estradiol tem sua taxa de produção variável durante o ciclo menstrual, variando desde níveis baixos de 50 μ g/L, no início da fase folicular, até valores mais elevados, chegando a 350 – 850 μ g/L, no pico da pré-ovulação (KASSAB, 2001).

Além da produção natural de hormônios dispõe-se, na atualidade, de um grande número de anticoncepcionais orais e injetáveis contendo estrogênios e progestagênios para uso clínico (KASSAB, 2001). No Brasil, o consumo de anticoncepcionais tem aumentado consideravelmente. De acordo com projeções realizadas pelo setor industrial farmacológico em 2006, existiam no Brasil aproximadamente 8.000.000 de usuárias de pílulas anticoncepcionais, havendo a perspectiva desse número chegar a 45.000.000 nas próximas duas décadas (FERNANDES, 2007). As principais razões para esta elevação na demanda do país por anticoncepcionais são o crescimento no poder aquisitivo, a elevação da participação da mulher no mercado de trabalho e o controle da fertilidade para o desenvolvimento profissional feminino (PERSCHÉ, 2008). As concentrações de HSFs nos anticoncepcionais variam de 30 a 300 μ g por comprimido. Destes, uma parte é absorvida, enquanto uma fração, que pode chegar a 80% é eliminada principalmente pela urina (FERNANDES, 2007).

Em relação à excreção, vários organismos eliminam quantidades diferentes de HSFs, dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou do estado de gestação

(LINTELMANN, KATAYAMA E KURIHARA, 2003). A eliminação ocorre diariamente pela urina e em menor proporção pelas fezes e, apesar de possuírem meia vida relativamente curta (cerca de 2 à 6 dias), são continuamente liberados no ambiente, o que lhes concede um caráter de persistência (JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000; ARAUJO, 2006).

Os estrogênios primeiramente são biotransformados no sistema hepático e parcialmente nos músculos, rins e gônadas, sendo oxidados, hidroxilados, desoxidados e metilados antes da conjugação com ácido glicurônico ou sulfato, transformando-se em compostos estrogênicos menos ativos. Além dos conjugados, muitos outros metabólitos polares, como a 16-hidroxi-estrona, podem estar presentes nas fezes e na urina (YING, KOOKANA E RU, 2002). Embora, em grande parte, sejam metabolizados e excretados na forma inativa, conjugada como glucuronídeos e sulfatos, a ação de enzimas produzidas por bactérias comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes facilmente os biotransformam em compostos biologicamente ativos e passíveis de desencadear efeitos, principalmente na biota (GHISELLI, 2006; KHANAL *et al.*, 2006; HUTCHINS *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2009).

O estrogênio sintético 17 α -Ethinilestradiol tem como via principal de biotransformação a 2-hidroxilação e a formação subsequente de éteres 2 e 3-metilícos correspondentes. A metabolização ocorre por hidrólise aromática e uma grande variedade de metabólitos metilados e hidroxilados é formada, estando presentes sob formas livres ou conjugadas com ácidos glicurônico e sulfúrico (ARAUJO, 2006).

Os progestagênios sintéticos são rápido e completamente absorvidos, após administração oral. Ligam-se amplamente às proteínas plasmáticas, como também às globulinas de ligação dos hormônios sexuais. A metabolização ocorre por redução da ligação dupla do anel insaturado e, após várias etapas, ocorre a glicuronização (GILMAN, HARDMAN e LIMBIRD, 2003). A Tabela 01 apresenta uma estimativa das taxas de excreção diária dos principais estrogênios naturais e do estrogênio sintético 17 α -Ethinilestradiol por seres humanos.

Outra importante fonte de HSFs é a pecuária, bastante significativa no Brasil. O aumento da população mundial acompanhado pelo aumento da necessidade de produção de alimentos promove crescimento da produção animal, que faz com que a sua contribuição para a contaminação ambiental por HSFs seja cada vez maior (LOPEZ, 2007). A excreção fecal e urinária de bovinos e suínos varia de 0,1 a 160 mg/dia (RAMAN *et al.*, 2004). Bovinos excretam principalmente pelas fezes, enquanto suínos, pela urina (KHANAL *et al.*, 2006). Segundo Larsson *et al.* (1999), a excreção de estrogênios por animais ocorre pela urina na forma conjugada (glucuronídeos e sulfatos), porém quando pelas fezes a excreção ocorre na forma não conjugada, ou seja, ativa biologicamente. Além da produção natural do organismo

de animais vivos, existe ainda a excreção advinda da utilização de fármacos aplicados em práticas clínicas veterinárias (COLUCCI, BORK E TOPP, 2001; ZHENG, 2008).

TABELA 01 - EXCREÇÃO DIÁRIA (μg) DE 17β -ESTRADIOL, ESTRONA, ESTRIOL E 17α -ETINILESTRADIOL POR SERES HUMANOS.

Excreção ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	17β - Estradiol	Estrona	Estriol	17α - Ethinilestradiol
Homens	1,6	3,9	1,5	-
Mulheres em menstruação	3,5	8,0	4,8	-
Mulheres em menopausa	2,3	4,0	1,0	-
Mulheres em gestação	259	600	6000	-
Mulheres	-	-	-	35

FONTE: JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA (2000); YING, KOOKANA E RU (2002); JOHNSON E WILLIAMS (2004).

Estudos realizados por Peterson, Davis e Orndorff (2000), Raman *et al.* (2004) e Zheng (2008) apresentaram concentrações de HSFs provenientes de estruturas de tratamento de resíduo animal, passíveis de causar contaminação ambiental. Segundo Raman *et al.* (2004), a contaminação ambiental por HSFs, proveniente de estações de tratamento e armazenamento de esterco animal, é mal documentada, negligenciando a importância desta fonte de poluição. Um dos motivos são as transformações físicas, químicas e biológicas que ocorrem, tais como: digestão anaeróbia parcial, diluição em água da chuva e degradação aeróbia termofílica, que podem alterar as concentrações dos HSFs significativamente.

2.1.3 MECANISMOS DE DEGRADAÇÃO E TRANSPORTE NO MEIO AMBIENTE

Em função das características dos compostos em estudo, alguns mecanismos contribuem para a determinação das rotas de transporte no meio ambiente e a eliminação destes compostos nas ETEs. Estes mecanismos consistem, principalmente, na biodegradação, na sorção aos sólidos suspensos e sedimentos superficiais do leito do corpo d'água, na adsorção ao solo, na volatilização e na fotólise (BAREL-COHEN *et al.*, 2006).

A adsorção ao sedimento superficial do corpo d'água ocorre, preferencialmente, nas primeiras 24 horas de contato, sendo maior para os hormônios com maior coeficiente de partição octanol água (K_{ow}) e para as partículas de menor tamanho (HOLTHAUS *et al.*, 2002). Segundo Gomes *et al.* (2004), os processos de sorção dos compostos são predominantes a partir do valor do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) igual a 3.

A biodegradação completa dos HSFs depende da destruição do anel fenólico. O fungo *Paecilomyces lilacinus* tem se mostrado capaz de realizar a clivagem do anel fenólico de bifenilas aromáticas em cinco metabólitos, portanto, acredita-se que possa ser capaz de degradar hormônios (GESELL *et al.*, 2001). Em estudos de tratamento enzimático tem sido demonstrada a capacidade de outras enzimas, além da β -glucuronidase e da sulfatase, na degradação dos HSFs, por meio do rompimento do anel fenólico como a lacase e a peroxidase (TANAKA *et al.*, 2009).

Em relação a degradação de HSFs por meio da luz, a fotólise, com 12 horas de luz/dia e sem redução dos níveis de luz devido à turbidez e à cor aparente da água, contribui para a degradação dos HSFs. Nesse caso, o 17 β -Estradiol e 17 α -Ethinilestradiol apresentam a meia-vida de 10 dias (JÜRGENS *et al.*, 2002, NGHIE, SCHAFER E ELIMELECH, 2004). De acordo com autores, a fotólise é um processo radicalar, onde as condições do meio interferem na eficiência da degradação. Pode ser considerada lenta, quando comparada à biodegradação, principalmente para o 17 β -Estradiol, e não se deve esperar que seja um mecanismo de remoção eficiente (NGHIE, SCHAFER E ELIMELECH, 2004; RAIMUNDO, 2007).

Quando não degradados pelos mecanismos acima descritos, os HSFs produzidos naturalmente ou consumidos como anticoncepcionais são transportados no meio ambiente por diferentes rotas (LOPEZ, 2007). Na Figura 05 é apresentada uma suposta rota ambiental que relaciona o processo de ingestão (ou produção) com a excreção de hormônios e a poluição das águas superficiais e subterrâneas. Primeiramente, os hormônios são produzidos ou consumidos como medicamentos, ocorre a excreção, na forma conjugada (ligado ao ácido glucurônico ou a sulfato), para a rede coletora de esgotos no caso dos humanos e em forma de resíduo para os animais. Em seguida, em alguns casos, o esgoto é lançado *in natura* nos corpos d'água, porém, em outros, o esgoto passa por tratamento em ETEs, e o efluente é lançado no corpo d'água. Em ambientes aquáticos, as inúmeras variáveis que atuam em conjunto, como temperatura, turbidez, pH, oxigênio dissolvido, radiação solar, matéria orgânica e concentração de diversas outras substâncias, tornam a tarefa de modelar o comportamento destes compostos bastante complexa (ARAÚJO, 2006).

Os animais, geralmente excretam HSFs no solo, que por sua vez, atinge o manancial superficial por escoamento, ou subterrâneo por infiltração. O mesmo pode ocorrer com o lodo de esgoto proveniente das ETEs quando reciclado na agricultura. Dessa forma, os HSFs podem ser encontrados em diversos compartimentos ambientais e como não são completamente removidos nos diferentes processos de tratamento de esgotos, podem retornar ao início da rota, sendo consumidos pela população e dando origem a um círculo vicioso.

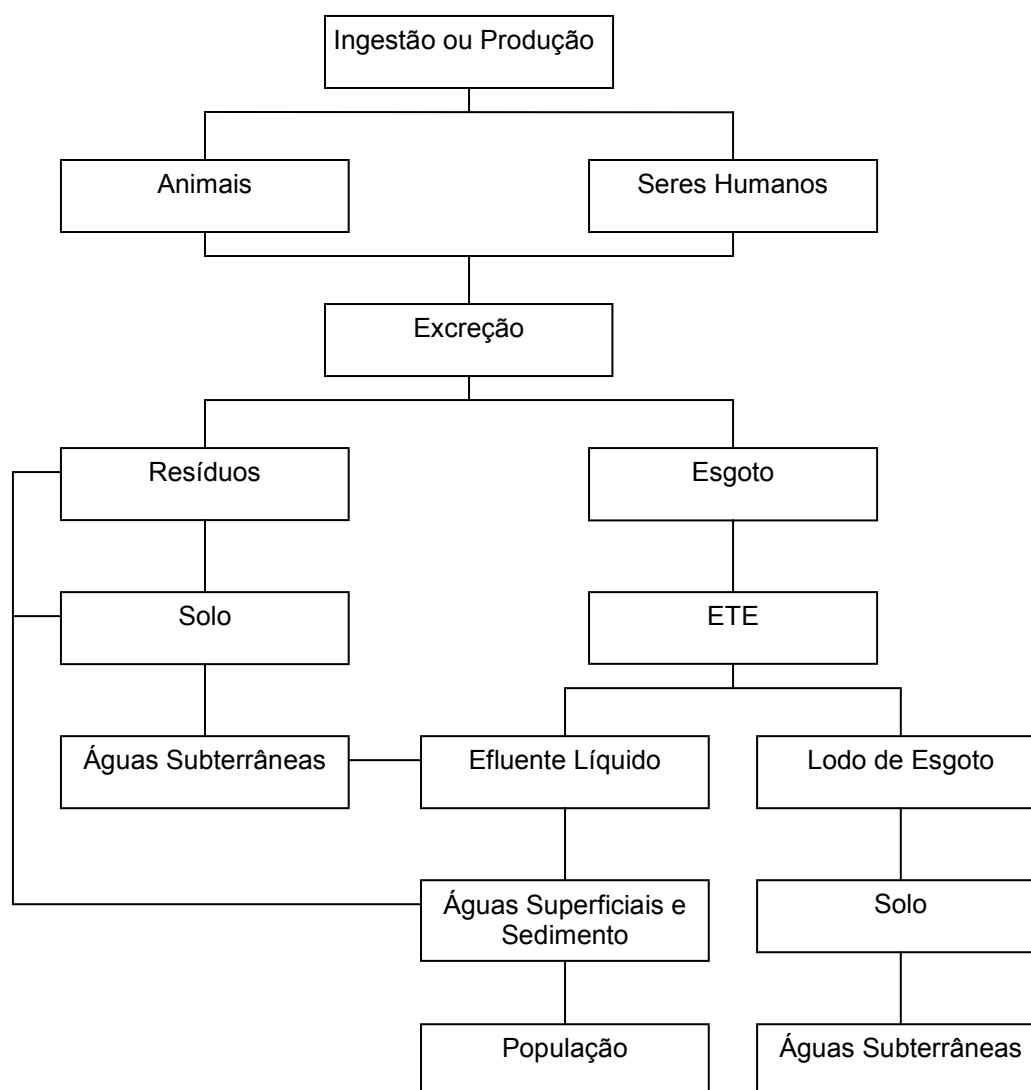


FIGURA 05 - PROVÁVEL ROTA DOS HSFs NO MEIO AMBIENTE

Adaptado de HALLING-SORENSEN *et al.* (1998) ; LINTELMANN, KATAYAMA E KURIHARA (2003)

FONTE: O AUTOR

2.1.4 REMOÇÃO DE HSFs NAS ETEs

A natureza hidrofóbica dos HSFs, estimada com base nos valores de K_{ow} , favorece a ocorrência de reações de adsorção no material particulado em suspensão. Assim, em estações de tratamento de água ou esgoto, espera-se que técnicas de separação mecânica, como a sedimentação, promovam uma remoção significativa destes compostos orgânicos, além do enriquecimento do lodo de esgoto com estas substâncias. Entretanto, os HSFs apresentam características físico-químicas que favorecem a sua permanência no efluente final, podendo não haver remoção significativa destes compostos nas ETEs. (RAIMUNDO, 2007; ARNON *et al.*, 2008).

Na maioria das estações de tratamento de esgoto, os principais mecanismos de remoção de compostos orgânicos envolvem (1) a adsorção em sólidos suspensos, (2) a associação dos compostos com ácidos graxos e óleos, (3) a biodegradação aeróbica ou anaeróbica, (4) a degradação química por processos de hidrólise ou nitrificação e (5) a volatilização (RAIMUNDO, 2007).

A remoção de HSFs da fase aquosa pode ser obtida por meio de alguns tipos de tratamento. Em tratamento biológico de esgoto, o pré-tratamento ocorre por meio do uso de grades e telas para a remoção de grandes objetos, incluindo trapos, plásticos, garrafas, etc. Uma grande quantidade de material orgânico continua na forma dissolvida e em suspensão, assim, não ocorre remoção significativa de HSFs durante o pré-tratamento (KHANAL *et al.*, 2006). No tratamento primário, ocorre a remoção de sólidos orgânicos por gravidade. Os HSFs são separados da fase aquosa por sedimentação e/ou flotação e durante a separação de óleos e graxas, sendo agregados ao lodo primário. A remoção destes compostos depende de três fatores: quantidade de lodo primário (sólidos sedimentáveis), coeficiente de partição dos HSFs entre a fase aquosa e o lodo primário e o tempo de detenção hidráulica (TDH). Quanto menor o TDH, menor a eficiência na remoção (KHANAL *et al.*, 2006).

No tratamento secundário, os HSFs são removidos da fase aquosa por adsorção aos flocos ou biofilmes, onde são mais eficientemente degradados por microorganismos (JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000). Dos diversos tipos de tratamentos convencionais, o tratamento por lodos ativados tem se mostrado o mais eficiente na remoção de HSFs, seguido do filtro biológico (TERNES *et al.*, 1999; JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000; KHANAL *et al.*, 2006).

Alguns estudos relatam a influência de diversos fatores na eficiência de remoção dos HSFs por lodos ativados tais como: o tempo de detenção hidráulica, carga, temperatura e composição dos flocos formados (quantidade de nutrientes e características hidrofóbicas) (TERNES *et al.*, 1999; JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000).

Para Khanal *et al.* (2006), o motivo da maior eficiência do sistema de lodos ativados se deve à nitrificação. Bactérias nitrificantes têm se mostrado eficientes na remoção de HSFs, porém exigem um longo período de tratamento. De acordo com Andersen *et al.* (2003), a remoção de HSFs ocorre com tempo de detenção hidráulica acima de 4 dias, apesar de obterem alta eficiência de remoção (em torno de 90%) com TDH de 11 a 13 dias. Lintelman, Katayama e Kurihara (2003) acreditam que a degradação biológica de HSFs apresenta uma forte dependência da concentração de nutrientes, na presença suficiente destes, a eficiência no tratamento é maior, do contrário a degradação ocorre, porém em menor extensão, sendo este fato relacionado à metabolização das lipoproteínas, principal fonte de nutrientes, pelos microorganismos empregados no tratamento biológico.

Em relação ao sistema anaeróbio, os resultados obtidos têm apresentado menor eficiência na remoção de HSFs, comparado aos sistemas aeróbios (LEE E LIU, 2002; SERVOS *et al.*, 2005; LOPEZ, 2007).

Outras técnicas de tratamento podem melhorar a eficiência das ETEs na remoção de HSFs tais como ozonização, radiação ultravioleta, membranas de filtração e carvão ativado (ANDERSEN *et al.*, 2003). Shafer, Nghiem e Waite (2003) obtiveram retenções de 80 a 90% dos HSFs pesquisados por nanofiltração. Ohko *et al.* (2002) degradaram 99% de 17 β -Estradiol por fotocatalise com TiO₂ e radiação ultravioleta após 30 min. Khanal *et al.* (2006) obtiveram remoção em torno de 90% de 17 β -Estradiol por adsorção em carvão ativado e Shappell *et al.* (2008) degradaram 80% de Estrona, 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol por catálise com peróxido de hidrogênio.

Na fase sólida, a biodegradação dos HSFs também é mais eficiente e mais rápida em meio aeróbio (KHANAL *et al.*, 2006). Em tratamento por digestão anaeróbia de lodo, Carballa *et al.* (2007) obtiveram remoções de 50% a 95% de estrogênios, sendo esta remoção, provavelmente, ligada à condição anaeróbia e ausência de nitrato. Para Joss *et al.* (2004), a degradação dos estrogênios está intimamente ligada ao potencial redox (presença de oxigênio) e é diferente para condições aeróbia, anaeróbia e anóxica. No solo, a fase gasosa do horizonte superficial tem um teor de oxigênio próximo da atmosfera [20% (v/v)]. Em horizontes mais profundos, a quantidade de oxigênio é variável e depende principalmente do grau saturação da água. No subsolo saturado, a atividade microbiana pode reduzir rapidamente o oxigênio, levando a uma condição anaeróbia. Assim, espera-se que a biodegradação ocorra mais rapidamente em horizontes superficiais e uma maior concentração de HSFs se acumule em camadas inferiores, devido a baixas quantidades de oxigênio (KHANAL *et al.*, 2006).

2.1.5 EFEITOS NOCIVOS AO SER HUMANO E AO MEIO AMBIENTE

Diante da baixa eficiência da maioria dos sistemas de tratamento de esgoto, em remover os HSFs, e aliado ao lançamento de esgoto sem tratamento, a presença dos HSFs no meio ambiente tem sido constantemente detectada, atraindo o interesse para a pesquisa (BELFROID *et al.*, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 2006; WEN *et al.*, 2006). Embora tais substâncias presentes no esgoto, apresentem baixas concentrações, atingem os mananciais e a água potável em níveis acima de 1ng/L (17 α -Etinilestradiol) e de 10ng/L (Estrona e 17 β -Estradiol), doses mínimas capazes de apresentar efeito tóxico à biota aquática e ao ser humano (HEISTERKAMP, GANDRASS E RUCK, 2003; BECK *et al.*, 2005; BAREL-COHEN *et al.*, 2006). Desta forma, o estado de degradação das águas superficiais, destinadas ao

abastecimento público, compromete a qualidade da água potável servida à população (RAIMUNDO, 2007).

O primeiro relato da presença de HSFs em águas superficiais foi feito por Purdom *et al.* (1994) e Fent *et al.* (1996), na Inglaterra, onde peixes estavam sendo contaminados por estrogênios provenientes de uma ETE, embora há mais de 20 anos já suspeitava-se de sua presença no meio ambiente (GHISELLI, 2006). A partir destes, diversos estudos têm mostrado a interferência dos HSFs em peixes, aves, répteis e mamíferos (KIRK *et al.*, 2003; HEALEY *et al.*, 2006; FALONE, 2007). Hahlbeck *et al.* (2004) observaram a reversão das gônadas sexuais na espécie de peixes selvagens *Gasterosteus aculeatus*, após tratamento com 17 α -Ethinilestradiol. Kidd (2007) relacionou a afeminização dos peixes da espécie *Pimephales promelas* (vairão) ao estrogênio sintético do esgoto oriundo de pílulas anticoncepcionais. Já Trainor *et al.* (2006) observaram o aumento da agressividade em pássaros relacionado ao aumento de estrogênio. Segundo Takeshi *et al.* (2003), os HSFs causam um distúrbio na maturação das gônadas sexuais em salmões, e ainda Heisterkamp *et al.* (2004) atribuíram à presença de estrogênios na água, interferências nos sistemas reprodutivos de organismos aquáticos, por exemplo, a afeminização de peixes machos, expostos à influência de estações de tratamento de esgoto. Há indícios também da interferência destes compostos no sistema imunológico de diversas espécies, ocasionando a exposição principalmente de peixes a doenças infecciosas e tumores (YIN *et al.*, 2006).

Como já mencionado, o principal efeito nocivo causado pelos HSFs é a disfunção do sistema endócrino, acarretando diversas consequências ao meio ambiente e ao ser humano. Consequências estas, que aos seres humanos, são difíceis de serem previstas (LINTELMAN, KATAYAMA E KURIHARA, 2003). Um exemplo da incapacidade de prever riscos à saúde foi o uso do hormônio estrogênico sintético dietilbestrol (DES), largamente utilizado nos anos 70, para prevenir aborto e supressão da lactação. Pesquisadores constataram um aumento na incidência de adenocarcinomas de cérvix e vagina nas filhas de pacientes que haviam utilizado o DES durante o primeiro trimestre da gravidez (ARAÚJO, 2006).

A principal resposta biológica de organismos aquáticos à presença de HSFs no meio ambiente é a indução à biossíntese da vitelogenina, uma proteína específica encontrada em vertebrados ovíparos do sexo feminino que pode ser sintetizada pelos machos, quando estes são expostos a compostos estrogênicos (PREZIOSI, 1998). Assim, a vitelogenina tem sido largamente utilizada como um biomarcador da atividade estrogênica. (KIDD, 2007).

Quanto à exposição crônica, doses baixas em tempo prolongado, há indícios de que homens expostos a compostos estrogênicos podem apresentar redução na fertilidade e desenvolver características secundárias do sexo feminino, como aumento das mamas

(ginecomastia). Existem evidências também de que o aumento da incidência de câncer de testículos e de outros males como a infertilidade masculina, pode estar relacionado com a ingestão de estrogênios por meio da alimentação ou da água. A exposição prolongada aos estrogênios também tem sido associada com o aumento da incidência de câncer de mama em mulheres (LOPEZ, 2007; BECK *et al.*, 2005; PONEZI *et al.*, 2006).

No Brasil, existem poucos dados sobre a manifestação de tais efeitos nos organismos aquáticos de mananciais brasileiros. Sabe-se que peixes curumbás (*Prochilodus lineatus*) do Rio Mogi Guaçu, estado de São Paulo, estão atingindo maturidade sexual em tamanho e idade inferior ao normal. Esse fato também tem sido atribuído aos HSFs, uma vez que 40% da população humana dos municípios dessa bacia hidrográfica são mulheres em idade reprodutiva e cerca de 80% dessas, fazem uso de anticoncepcional (RAMOS, 2002 *apud* LOPEZ, 2007).

Diante da constante presença de HSFs no meio ambiente, conforme apresentado no texto acima, e os efeitos nocivos por eles causados, torna-se de grande importância o monitoramento destes compostos nas matrizes ambientais.

2.1.6 - ESTRUTURA MOLECULAR E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Os estrogênios apresentam em sua estrutura molecular um grupo fenólico e em alguns casos um grupo hidroxila alifático, enquanto nos progestagênios este grupo fenólico é substituído por um grupo cetona conforme apresentado na Figura 06 (VENDRAMI, 1998; HEISTERKAMP, GANDRASS E RUCK, 2004; GHISELLI, 2006). A alteração molecular do 17 β -Estradiol é responsável pela síntese do 17 α -Ethinilestradiol, principal estrogênio sintético utilizado em anticoncepcionais (KHANAL *et al.*, 2006).

Como já mencionado, os estrogênios são excretados na forma conjugada, como glucuronídeos e sulfatos. Entretanto, em presença de enzimas β -glucuronidase, provenientes de bactérias como a *Eschericia coli* por exemplo, comumente encontrada em áreas de despejos, ocorre a hidrólise das formas conjugadas e inativas dos estrogênios em formas biologicamente ativas, conforme apresentado na Figura 07. Esta reação é considerada termodinamicamente irreversível, completa e tem como resultado um aumento na toxicidade (estrogenicidade) destas moléculas (KHANAL *et al.*, 2006; HUTCHINS *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2009).

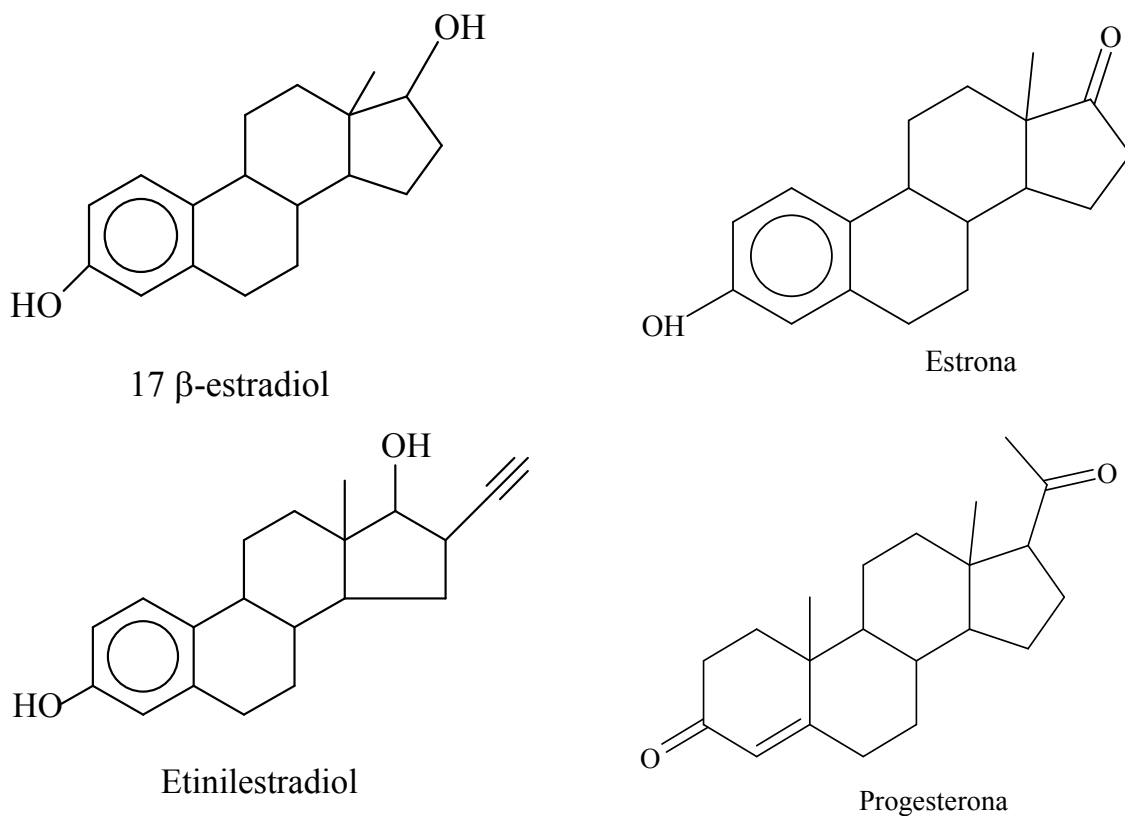


FIGURA 06 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS QUATRO HSFs ESTUDADOS

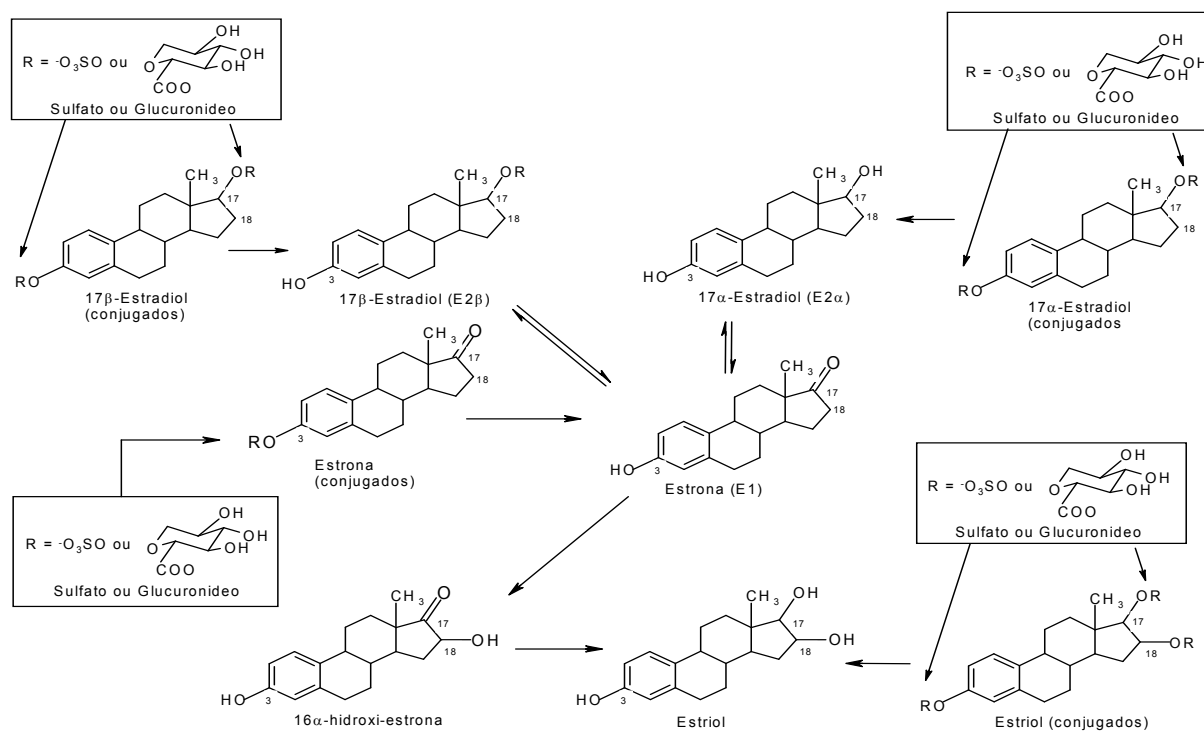
FONTE : CARBALLA *et al.* (2004); KHANAL *et al.* (2006)

FIGURA 07 - ESQUEMA DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE MOLÉCULAS ATIVAS DE ESTROGÊNIOS A PARTIR DE MOLÉCULAS INATIVAS E CONJUGADOS

FONTE : HUTCHINS *et al.* (2007)

Em relação ao transporte, o destino e comportamento de qualquer composto no ambiente e nas ETEs são influenciados por suas propriedades físicas e químicas, que regem a partição na água, solo ou biota (RAIMUNDO, 2007). Parâmetros tais como coeficiente de partição octanol/água (Kow), constante de dissociação (pKa), solubilidade em água, entre outros, determinam se o composto possui tendência a ser transportado no meio aquático, bioacumular na cadeia alimentar ou ainda sofrer interação com o sedimento. Compostos com baixa solubilidade e elevado valor de Kow, geralmente estão presentes em tecidos gordurosos na biota, o que promove a bioacumulação na cadeia alimentar (CARBALLA, OMIL E LEMA, 2008). A Tabela 02 apresenta algumas propriedades físico-químicas dos quatro HSFs estudados neste trabalho.

TABELA 02 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HSFs

Hormônio	MM (g/mol)	pKa	Log Kow	Pressão de vapor	Solubilidade sat a 25 C (mg/L)
17β-Estradiol	272,38	10,5 – 10,7	3,94	$2,3 \times 10^{-10}$	12,9
Estrona	270,37	10,3 -10,8	3,43	$2,3 \times 10^{-10}$	12,4
17α-Etinilestradiol	296,41	10,4	4,15	$4,5 \times 10^{-11}$	4,8
Progesterona	314, 46		3,62	ne	8,8

FONTES: LAI *et al.* (2000); LOPEZ DE ALDA *et al.* (2002); LINTELMANN, KATAYAMA e KURIHARA (2003); KHANAL *et al.* (2006)

NOTA : ne: não encontrado

Quanto à solubilidade dos HSFs (Tabela 02), pode-se observar que a mesma é muito alta quando comparada à concentração mínima capaz de causar efeito biológico em organismos aquáticos que é de 10 ng/L para a Estrona e 17β-Estradiol e de 1ng/L para o 17α-Etinilestradiol (BAREL-COHEN *et al.*, 2006; HEISTERKAMP, GANDRASS E RUCK, 2003; BECK *et al.*, 2005;). Em relação aos valores de Kow, Gomes *et al.* (2004) considera uma natureza lipofílica para compostos que apresentam valores acima de 3,0. Assim, de acordo com os valores de Kow apresentados na Tabela 02, observa-se que os HSFs, tanto naturais quanto sintéticos, apresentam natureza lipofílica, indicando que a interação com a matéria orgânica é favorecida e a infiltração e percolação são limitadas (LOPEZ, 2007). No entanto, em relação aos estrogênios, a esterificação com gluconídeos ou ácidos alteram drasticamente as propriedades físicas e químicas desses estrogênios que, quando conjugados, passam a ser mais hidrofílicos e menos ativos biologicamente, podendo permanecer por mais tempo em ambientes aquáticos (BIRKETT E LESTER, 2009).

Em relação ao Kow, apesar de elevados valores indicarem que o composto hidrofóbico é menos solúvel e possui tendência à se adsorver às partículas do solo, limita-se

a informar a relação da concentração em equilíbrio de um composto orgânico na fase octanol, em relação à concentração deste composto na fase aquosa (D'AGOSTINHO E FLUES, 2006). Por outro lado, a determinação do coeficiente de partição K_d , calculado a partir de concentrações do composto no sedimento e na água, considera as características do sistema, representando de forma mais eficiente, a mobilidade do composto no meio ambiente e sua relação com as características químicas e limnológicas do meio (KHANAL *et al.*, 2006).

Para avaliar a capacidade do composto em adsorver à partícula sólida, considerando suas propriedades físico-químicas, pode ser calculado o K_{oc} , a partir dos valores de K_d . O K_{oc} é o coeficiente de partição sedimento/água corrigido pela matéria orgânica do solo, mais especificamente o carbono orgânico total, e representa a medida da força de sorção entre o composto e o sedimento (D'AGOSTINHO E FLUES, 2006). No Manual de valores de K_{oc} para solo, *Soil Screening Guidance*, (EPA, 1996) são apresentados valores de K_{oc} para diversos compostos, no entanto, não são apresentados valores de K_{oc} para nenhum dos HSFs pesquisados. Dessa forma, para HSFs, tanto o K_d como o K_{oc} são calculados por meio das concentrações obtidas em campo e comparadas com valores observados na literatura.

O conhecimento das características físicas e químicas dos HSFs também facilita o planejamento de métodos para a sua determinação analítica em matrizes ambientais. Neste caso, as baixas pressões de vapor dos HSFs apontam para a dificuldade da análise por cromatografia gasosa diretamente, uma vez que as substâncias são pouco voláteis. Entretanto, esta dificuldade tem sido superada pela utilização de cromatografia líquida ou pela derivatização para análise por cromatografia gasosa (LOPEZ, 2007).

2.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Apesar de apresentar um grande potencial para causar efeitos nocivos ao meio ambiente, as concentrações de HSFs presentes nas diversas matrizes ambientais são pequenas, na ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L ou $\mu\text{g/kg}$ e ng/kg . Desta forma, torna-se um desafio analítico a determinação destes compostos traço, por meio de métodos sensíveis e confiáveis. Aliado às baixas concentrações, ainda surgem problemas relacionados à complexidade de algumas matrizes, como o esgoto doméstico, que apresenta em sua composição uma infinidade de compostos que podem interferir na análise (GHISELLI, 2007; FALONE, 2007).

A cromatografia, acoplada à espectrometria de massa tem sido a técnica mais utilizada na determinação de HSFs, principalmente a cromatografia gasosa (GC/MS), entretanto, a cromatografia líquida (LC/MS) teve a sua popularidade aumentada nos últimos

anos (BELFROID *et al.*, 1999; PETROVICÉ *et al.* 2001; BECK *et al.*, 2005). Apesar da grande eficiência e sensibilidade da cromatografia acoplada à espectrometria de massa, atualmente sua aplicação na determinação de HSFs tem sido limitada, devido ao seu alto custo e muitas vezes complexidade (YACABE, HONDA E MAGALHÃES, 2005; ZHOU, WANG E JIA, 2007). Além do alto custo, a análise de HSFs por CG/MS, ainda requer um processo denominado derivatização, devido às baixas pressões de vapor dos HSFs (Tabela 02).

Além da cromatografia acoplada à espectrometria de massa, a cromatografia líquida com detectores de arranjo de diodos e fluorescência também pode ser utilizada na determinação de HSFs, sendo que o detector de arranjo de diodos é, dentre os detectores, o de menor custo comparado à espectrometria de massa, além de ser o detector mais utilizado em determinações analíticas de poluentes ambientais por CLAE (DEGANI, CASS E VIEIRA, 1998).

No campo de pesquisas na área de resíduos de poluentes ambientais, além da técnica analítica, a escolha do método a ser utilizado é uma etapa muito importante. Atualmente, todo método de análise é baseado em uma tecnologia anterior ou literatura existente, utilizando a mesma ou semelhante instrumentação. É raro que um método de CLAE seja desenvolvido e não relacione ou compare com abordagens existentes na literatura (SWARTZ E KRULL, 1997). Neste processo ocorre a escolha de diversos parâmetros tais como coluna, fase móvel, detector, etc. Entretanto, é necessário que haja uma confirmação de que este método, desenvolvido a partir de outros, seja apropriado para o uso pretendido (LEITE, 1996).

A validação é uma comprovação, por meio de fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2003). Segundo Leite (1996):

“Não ter validação é ter apenas um número e não um resultado”.

No Brasil, há três agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e o MAPA (Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003; MAPA, 2003). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, como:

- a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e a Resolução ANVISA RE no 475, de 19 de março de 2002, aplicada a métodos bioanalíticos para a determinação quantitativa de fármacos e/ou seus metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma ou urina;

- o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003, um documento guia, mais abrangente, para o procedimento de validação de métodos analíticos;
- a Instrução Normativa nº 46 de 10 de junho de 2003 intitulada como Regulamento Técnico Mercosul sobre critérios para validação de métodos analíticos.

Primeiramente, a validação consiste da verificação da calibração do cromatógrafo, baseada em parâmetros definidos pela *United States Food and Drug Administration*. São eles: fator de retenção, resolução, fator de alargamento e número de pratos teóricos (USFDA, 2001). Estes parâmetros permitem verificar a conformidade com o sistema cromatográfico, uma vez que a ANVISA e o INMETRO ao estabelecerem suas normas já esperam que os equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e os analistas qualificados e devidamente treinados.

De acordo com Thompson, Ellison e Wood (2002), existem dois tipos distintos de validação de métodos: o primeiro foi denominado validação no laboratório "*in house validation*", em que as etapas de validação são realizadas em um único laboratório, seja para verificar se um novo método tem sido desenvolvido adequadamente ou para verificar se um método adaptado de outras fontes está apropriado. O segundo tipo trata da validação completa "*full validation*" e envolve todas as características de desempenho de um estudo interlaboratorial utilizado para verificar como uma metodologia se comporta em uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza associada à metodologia como um todo. Neste trabalho será realizada a validação no laboratório.

É importante lembrar que não existe um modelo pré-definido para sistemas de validação, sendo necessário ajustar e adequar as melhores adaptações (LEITE, 1996). Alguns parâmetros são exigidos pela ANVISA e INMETRO: linearidade e faixa de aplicação, seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Entretanto, os parâmetros a serem avaliados na validação dependem do experimento, na intenção do uso do método analítico, pois nem sempre é necessário levar todos os critérios em consideração. Deve-se selecionar os critérios de maior relevância para obter o melhor processo de validação (FALONE, 2007).

Além da determinação analítica de HSFs por técnicas devidamente validadas, outros parâmetros analíticos também são importantes na avaliação da qualidade da água de uma região. Apesar da principal fonte de contaminação dos corpos hídricos por HSFs ser o lançamento de efluentes domésticos (JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000; ARAUJO, 2006), esta fonte de poluição antrópica não é a única fonte de poluição das águas superficiais.

Os ambientes aquáticos, ao longo do tempo, têm se tornado sistemas cada vez mais complexos, detentores de um número cada vez maior de substâncias dissolvidas,

suspensas, adsorvidas, sedimentadas, etc, devido a sua constante interação com o comportamento humano (PHILIPPI Jr, 2005). Sendo assim, além dos efluentes domésticos as fontes são muitas, os efluentes industriais e o escoamento superficial urbano e rural são alguns exemplos que podem ser citados (GIORDANO, 1999). Diante disso, faz-se necessário, a realização de uma série de determinações analíticas com o intuito de avaliar a qualidade da água do corpo hídrico a ser estudado. Determinados ensaios podem fornecer informações tais como fontes e estágios de poluição e potencial do metabolismo biológico do corpo hídrico (VOGT *et al.*, 1998). A determinação de variáveis limnológicas é útil para a obtenção de um melhor entendimento da ocorrência de HSFs na região e suas interações no meio ambiente.

Segundo a Resolução Conama nº 357 de 17/03/2005, alguns parâmetros físicoquímicos são capazes de fornecer informações representativas da qualidade da água de um determinado corpo hídrico, em relação ao seu uso preponderante. São estes parâmetros: potencial hidrogeniônico (pH), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), série de nitrogênio, fósforo total e dissolvido, oxigênio dissolvido, turbidez, cor, sólidos dissolvidos, cloreto, sulfato e metais, dentre outros, relacionados ao uso da bacia.

Além dos parâmetros citados pela referida resolução, outras determinações analíticas são capazes de fornecer informações importantes a respeito das características da água e do sedimento e fontes de poluição em um corpo hídrico, assim como as interações físicas e químicas entre os poluentes, são elas: demanda química de oxigênio (DQO), alcalinidade total, condutividade, carbono orgânico dissolvido (COT), espectroscopia de ultravioleta e espectroscopia de emissão de fluorescência em matrizes de água (PHILIPPI Jr, 2005). Já em sedimento, teores de matéria orgânica e composição física das amostras (silte, areia e argila) podem fornecer informações úteis para o entendimento de processos de adsorção (ZANG *et al.*, 2009). Tanto a espectroscopia na região do ultravioleta visível, como a espectroscopia de emissão de fluorescência, são utilizadas, atualmente para caracterizar a composição estrutural do carbono orgânico dissolvido e identificar suas possíveis fontes nos ecossistemas estudados (KNAPIK *et al.*, 2009;).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para cumprir os objetivos deste trabalho, a descrição dos procedimentos adotados foi dividida em quatro etapas: 3.1 - caracterização da Área de Estudo, 3.2 - otimização dos procedimentos analíticos de HSFs, 3.3 - validação dos métodos analíticos e 3.4 - campanhas amostrais.

A caracterização da área de estudo foi uma etapa preliminar aos procedimentos analíticos que teve por objetivo a investigação de suas particularidades, tornando possível a obtenção de informações, capazes de direcionar as atividades da pesquisa.

Sendo a área estudada, uma região com grandes adversidades, a localização dos pontos monitorados foi escolhida de acordo com as características particulares de cada região e sua capacidade de fornecer informações sobre as influências e alterações da qualidade da água ao longo do trecho estudado.

As etapas de otimização e validação dos métodos analíticos constituem o conjunto de ações direcionadas a cumprir o objetivo de disponibilizar um novo método analítico para a determinação de HSFs em matrizes ambientais de água superficial e sedimento utilizando o detector de ultravioleta, um detector de menor custo e maior facilidade de operação, comparado ao usual, em análises de HSFs, que seria o detector de massas.

As etapas que compõem o processo de definição destes métodos analíticos podem ser utilizadas, na sequência em que se apresentam, na definição de outras metodologias que utilizem a técnica de cromatografia.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo localiza-se na bacia do Altíssimo Iguaçu, em Curitiba e Região Metropolitana, Estado do Paraná. A bacia do Altíssimo Iguaçu tem suas nascentes junto à Serra do Mar, cujo rio principal é o rio Iguaçu que estende-se por, aproximadamente, 90 km até o limite da Região Metropolitana de Curitiba. A área de drenagem desta bacia é de cerca de 3.000 km², a população média é de três milhões de habitantes distribuídos em 14 municípios, concentra cerca de 25% da população total e 30% da população urbana do estado do Paraná e apresenta baixos índices de atendimento e tratamento de esgoto (PORTO *et al.*, 2007).

Na presente pesquisa, foi monitorada a parte superior da Bacia do Altíssimo Iguaçu, incluindo as sub-bacias dos rios Atuba, Palmital, Iraí, Iraizinho, Itaqui, Pequeno e Piraquara. Em relação aos recursos hídricos, esta região possui áreas ainda preservadas, com potencial para abastecimento público, e áreas com intensa ocupação antrópica. Esta região pode ser segmentada em três seções, nas quais foram monitorados ao todo, sete pontos,

determinados de acordo com as particularidades de cada seção. A Figura 08 apresenta um esquema da parte superior da Bacia do Altíssimo Iguaçu com a indicação da localização dos pontos amostrados.

Na seção inicial da bacia, encontram-se os rios Iraí, Iraizinho e Piraquara. Estes rios drenam uma área aproximada de 283,4 km², com a maior parte preservada. Nesta região, estão localizados dois reservatórios de abastecimento em operação, Iraí e Piraquara I, e um terceiro em construção, o Piraquara II. Nesta seção não foram definidos pontos de monitoramento.

A segunda seção engloba o Canal Paralelo (Canal Extravisor) e dois afluentes, o Itaqui e o Pequeno, abrangendo uma área aproximada de 195,5 km². O Canal Paralelo foi inicialmente construído para o controle de cheias na Bacia do Altíssimo Iguaçu, com extensão de 20 km, e segue paralelamente ao rio Iguaçu, com início a montante da confluência entre os rios Iraí e Palmital, considerado como o km 0 do rio Iguaçu, de acordo com Porto *et al.*, (2007), até as proximidades da foz do rio Miringuava.

A função hoje do Canal Paralelo é a de prover água para o abastecimento humano, uma vez que houve uma separação entre os rios poluídos, Palmital e Atuba (com foz no rio Iguaçu) e rios ainda com boa qualidade de água, Iraizinho e Piraquara (com foz no rio Iraí, a montante do início do Canal Paralelo), e Itaqui e Pequeno (com foz no Canal Paralelo). A captação é realizada no Canal Paralelo, a jusante da foz do rio Pequeno, numa região paralela à foz do rio Atuba. No entanto, apesar de ser considerada uma área de manancial, esta região está sofrendo um processo de ocupação irregular de suas várzeas, principalmente na margem esquerda do Canal Paralelo, com sérias implicações na qualidade da água. Devido a este fato, foram monitorados dois pontos nesta região, um no rio Itaqui, pouco antes de entrar no Canal Paralelo denominado **IT-01 (Latitude: 25°23'25"S e Longitude: 49°09'09"W)** e outro no Canal Paralelo após a foz do rio Pequeno, denominado **CP-01 (Latitude: 25°27'56" S e Longitude: 49°10'17"W)**.

Na terceira seção estão as sub-bacias dos rios Palmital e Atuba. A bacia do rio Palmital abrange cerca de 95 km², com 184.354 habitantes em 2005, com uma taxa de 20% de coleta e tratamento de esgotos, englobando parte dos municípios de Pinhais e Colombo (KNAPIK, 2006, PORTO *et al.*, 2007). A bacia do rio Atuba é a terceira sub-bacia mais densa na Bacia do Altíssimo Iguaçu, principalmente na sua parte central, e contemplava, no ano de 2005, cerca de 450.460 habitantes, dados estes levantados nos estudos realizados por Porto *et al.* (2007). Destes, menos da metade possui sistema de coleta e atendimento de esgoto (47%).

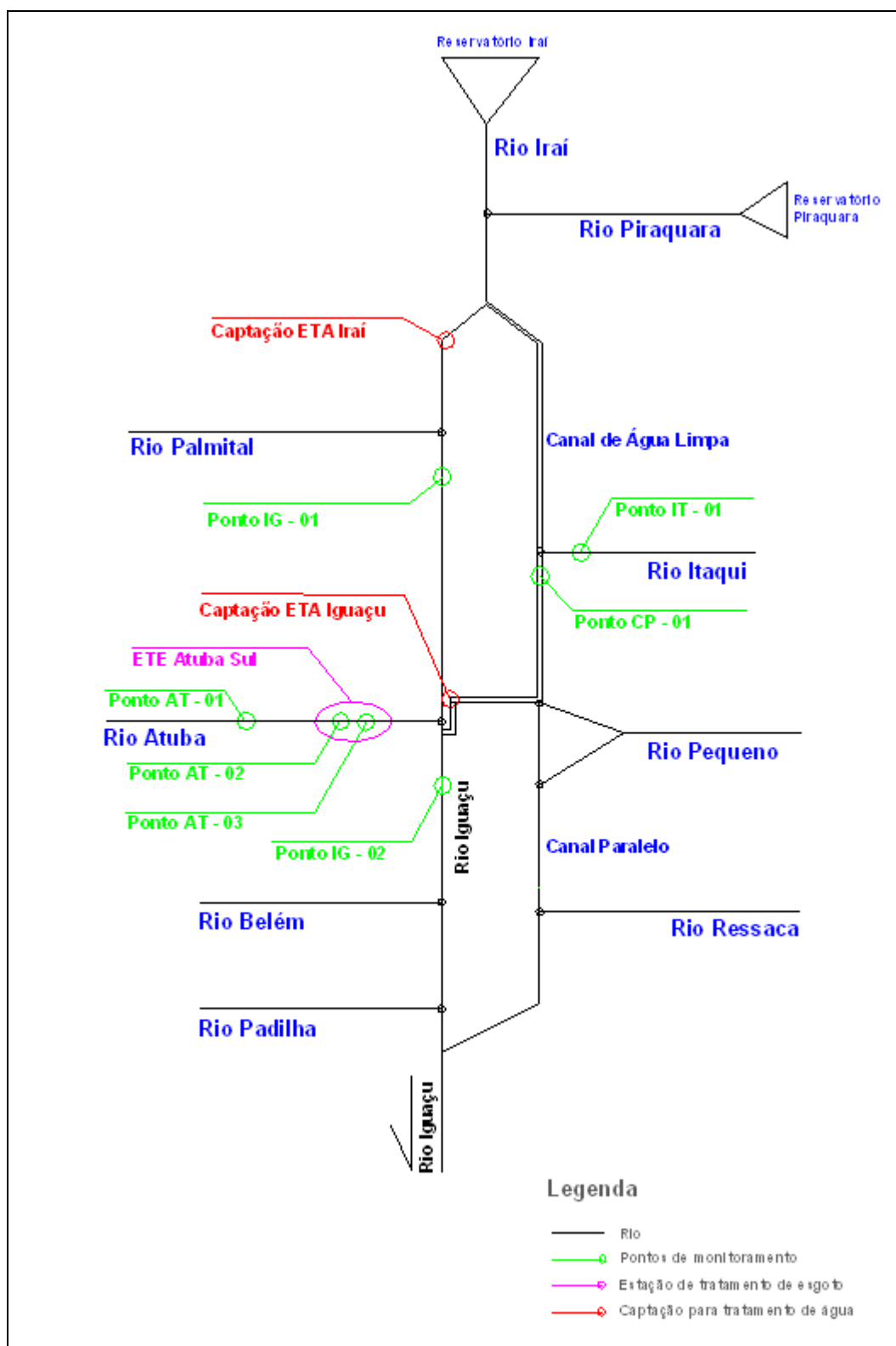


FIGURA 08 – ESQUEMA DA PARTE SUPERIOR DA BACIA DO ALTO IGUAÇU COM A LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS AMOSTRADOS

FONTE: PORTO *et al*, 2007

A ETE Atuba Sul, localizada nas proximidades da exutória da bacia, e tendo o rio Atuba como corpo receptor, possui uma vazão média de 700,5 L/s, e uma concentração média do efluente de 70,1 mg/L, com eficiência de 68 % no sistema de RALF. Atualmente a ETE Atuba Sul está operando abaixo da sua capacidade de projeto, inicialmente construída para atender 568.194 habitantes, com uma vazão de 1.450,00 l/s (SUDERHSA, 2000; PORTO *et al.*, 2007). Através de pesquisa em campo foram observadas as seguintes etapas no tratamento de efluentes na ETE Atuba Sul, conforme esquema apresentado na Figura 09. Nessa seção, foram monitorados cinco pontos: dois localizados no rio Iguaçu (IG-01 e IG-02) e três no rio Atuba (AT-01, AT-02 e AT-03). A escolha dos pontos monitorados no rio Atuba levou em consideração a presença da ETE Atuba Sul: um localizado a aproximadamente 500m à montante da ETE, **AT-01 (Latitude: 25°27'52"S e Longitude: 49°11'26" W)**, e os outros dois imediatamente à montante e à jusante do lançamento da ETE Atuba Sul, **AT-02 (Latitude: 25°28'17" S e Longitude: 49°11'06" W)** e **AT-03 (Latitude: 25°28'21" S e Longitude: 49°11'06" W)**.

No rio Iguaçu, o ponto mais a jusante, **IG-01 (Latitude: 25°27'14" S e Longitude: 49°10'17" W)**, está localizado após a foz do rio Palmital e o último ponto monitorado **IG-02 (Latitude: 25°29'01" S e Longitude: 49°11'22" W)**, no município de São José dos Pinhais, limite com Curitiba, está localizado 100m à jusante da foz do rio Atuba. Este ponto possui uma área de drenagem de aproximadamente 625,5 km², englobando as bacias dos rios Atuba, Iraí, Iraízinho, Itaqui, Palmital, Pequeno, Piraquara e a região superior da bacia do rio Iguaçu. Em termos demográficos, esta área abriga um montante de aproximadamente 810.000 habitantes, com porcentagens de coleta e tratamento de esgoto na faixa de 20 a 47% no ano de 2005 segundo levantamento realizado por Porto *et al.* (2007). Neste ponto, está localizada a estação Ponte BR 277 (Cód. Fluv. 65009000) com sistema de telemetria e leitura de nível.

É importante lembrar que o trecho do rio Iguaçu, compreendido entre o início do Canal Paralelo e a foz do rio Atuba, possui duas denominações distintas, sendo que para Porto *et al.* (2007), denomina-se rio Iguaçu e para Sudersha (2000) denomina-se Iraí. Neste estudo, foi adotada, para este trecho, a denominação rio Iguaçu, conforme Porto *et al.* (2007).

A localização dos pontos amostrados está apresentada na Figura 10.

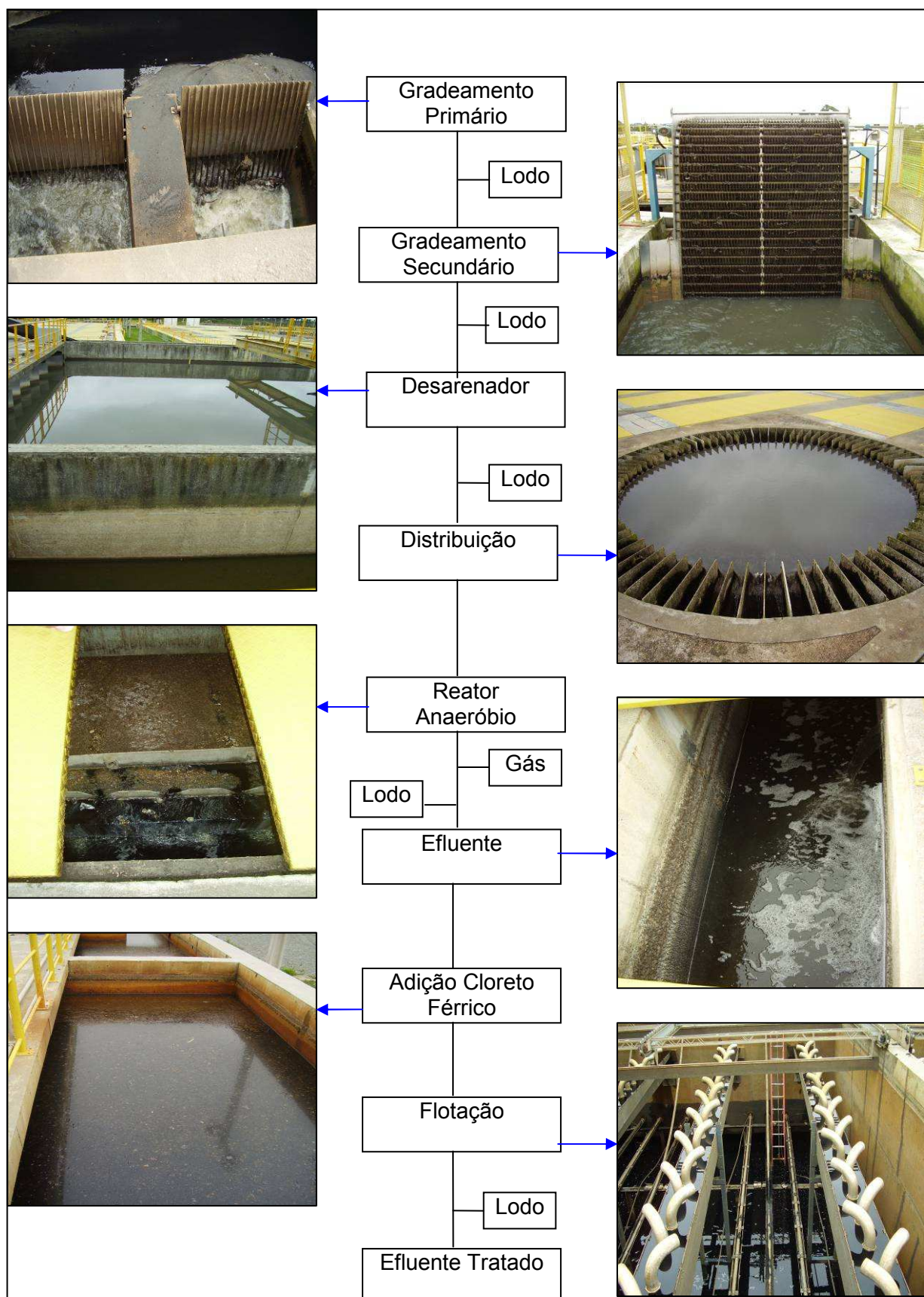


FIGURA 09 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DO PROCESSO DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR REATOR ANAERÓBIO COM MANTA DE LODO

FONTE: O AUTOR

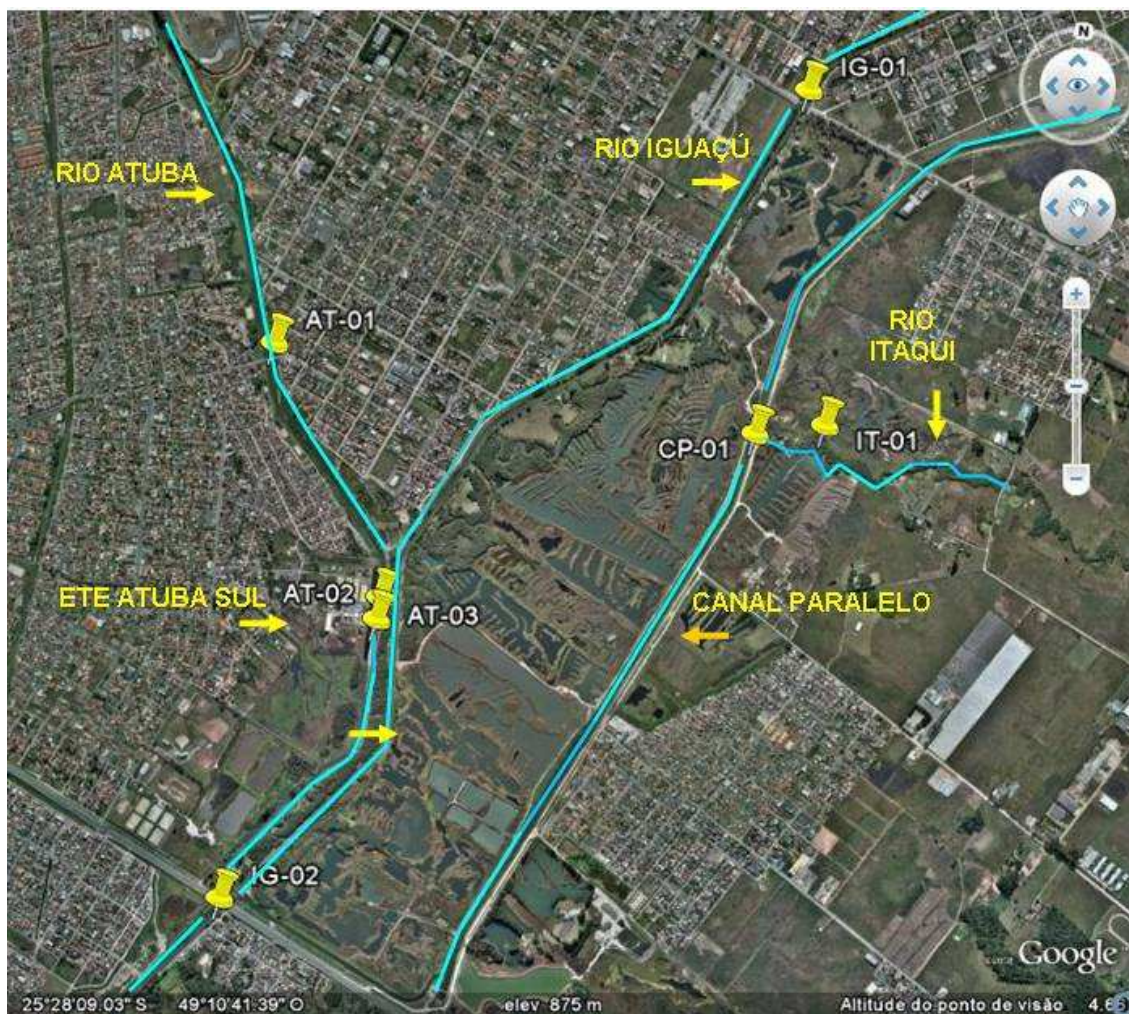


FIGURA10 - MAPA COM A LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS AMOSTRADOS, SENDO: AT: RIO ATUBA, IG: RIO IGUAÇU, IT: RIO ITAQUI E CP: CANAL PARALELO

FONTE: GOOGLE EARTH (2009)

3.2 OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS DE HSFs.

Devido às baixas concentrações de HSFs normalmente encontradas no meio aquático, foram adotados diversos procedimentos para reduzir possíveis contaminações durante o processo de amostragem, armazenamento, extração e injeção das amostras. Foram adotadas técnicas limpas em todas as etapas deste trabalho.

Todos os materiais e vidrarias utilizados foram devidamente lavados com água corrente, detergente Extran e enxaguados com água deionizada e acetona. As vidrarias não volumétricas (como *via/s*) utilizadas para armazenar os extratos, foram transferidas para secagem em mufla a 440°C por 2 horas conforme recomendado por Ghiselli (2006), como forma de eliminar resíduos orgânicos. Já a vidraria volumétrica foi deixada por aproximadamente 24 horas em solução de Extran 8% (v/v).

Todos os solventes orgânicos utilizados, tais como: etanol, metanol, acetonitrila, acetona, hexano e diclorometano, possuem alto grau de pureza (grau HPLC) e foram provenientes da Merck e J.Baker. A Tabela 03 apresenta informações sobre os padrões analíticos utilizados na determinação dos compostos pesquisados.

TABELA 03 - NÚMERO CAS, MARCA, PUREZA E NOME IUPAC DOS COMPOSTOS PESQUISADOS

Hormônio	CAS	Marca	Pureza	Nome IUPAC
17 β -Estradiol	50-28-2	Sigma	97%	estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol
Estrona	53-16-7	Sigma	99%	3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17-ona
17 α -etinilestradiol	57-63-6	Sigma	98%	19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ino-3,17 α -diol
Progesterona	57-83-0	Sigma	98%	pregn-4-eno-3,20-diona

FONTE: *CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE-CAS*, 2009; *INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY-IUPAC*, 2009

A determinação dos HSFs foi realizada em um cromatógrafo de fase líquida da Shimadzu, equipado com bomba peristáltica modelo LC 20AT, degaseificador modelo DGU-20A e detector de ultravioleta com arraste de diodos modelo SPD M20A. O volume de injeção foi de 20 μ L e a coluna cromatográfica utilizada na separação dos HSFs foi uma ODS C8 (octadecilsilano) 4,6 mm x 15 cm da Shimadzu.

Os métodos analíticos envolveram extração, purificação e concentração dos HSFs da amostra e determinação por CLAE-DAD. Para determinar as condições ótimas de análise diversos testes foram realizados em todas as etapas deste trabalho. Algumas referências encontradas na literatura foram tomadas como base e, a partir delas, foram realizadas alterações nos procedimentos analíticos, buscando a otimização que foi dividida em duas partes: análise cromatográfica e extração e concentração dos analitos.

3.2.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Inicialmente, foi estudada a melhor separação cromatográfica para os quatro hormônios estudados denominados E1: estrona, E2: 17 β -estradiol, EET: 17 α -etinilestradiol e PG: progesterona. A fase móvel utilizada foi a acetonitrila e água, sendo testada a fase móvel (FM) eluída no modo isocrático e com gradientes de eluição. Na eluição isocrática da FM, foram testadas as porcentagens de 30, 50, 70 e 90% de ACN. Na eluição com gradiente, foram testadas duas seqüências apresentadas na Figura 11.

Para a verificação do melhor fluxo da FM foram testados fluxos de 0,8 a 2,0 mL/min. Tanto para a definição do modo de eluição da FM como para a definição do fluxo

foram avaliados os parâmetros: fator de alargamento dos picos, resolução e tempo de análise. O comprimento de onda a ser utilizado foi determinado, analisando o espectro de absorção de luz ultravioleta pelos padrões analíticos e gráficos 3D, fornecidos pelo software do cromatógrafo.

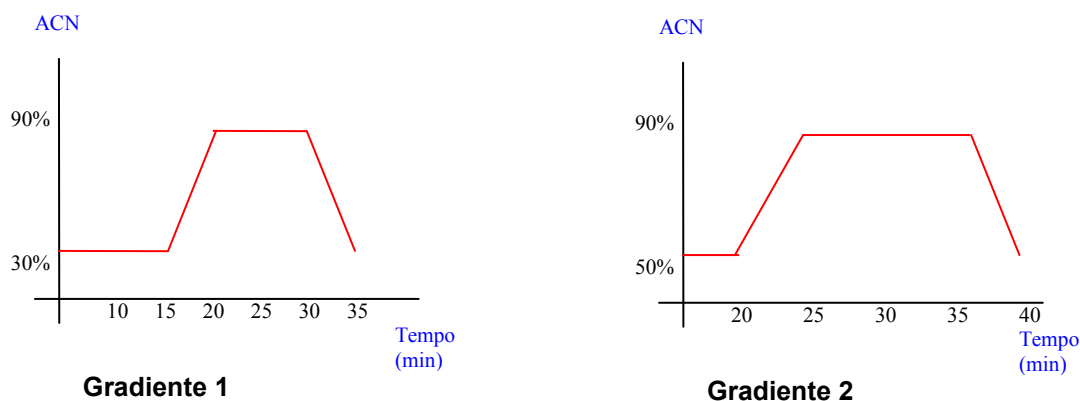


FIGURA 11 - GRADIENTES DE FASE MÓVEL, TESTADOS

FONTE: O AUTOR

3.2.2 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS

Devido às baixas concentrações e ao grande número de compostos presentes nas matrizes ambientais, os HSFs requerem um processo de extração prévio à detecção. Neste trabalho foi utilizada a extração em fase sólida (EFS), antecedida de ultrasson, no caso das amostras de sedimento.

A extração em fase sólida é utilizada para concentrar e isolar um ou mais analitos, presentes em amostras complexas, antes da detecção utilizando a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (FALONE, 2007).

Neste estudo, foram utilizados cartuchos com fase estacionária de sílica gel quimicamente ligada ao grupo orgânico apolar C18 e cartuchos florisil. Os cartuchos são seringas de polipropileno, que contêm material adsorvente entre dois discos de polietileno (frits). A parte inferior do cartucho foi acoplada em uma cuba coletora de amostra onde foi efetuado vácuo, conforme apresentado na Figura 12. Dessa forma, os HSFs não polares ficaram retidos na fase sólida não polar, enquanto as impurezas que são polares foram eluídas. Como eluente para os HSFs, foram utilizados diversos solventes de acordo com cada teste de extração realizado.

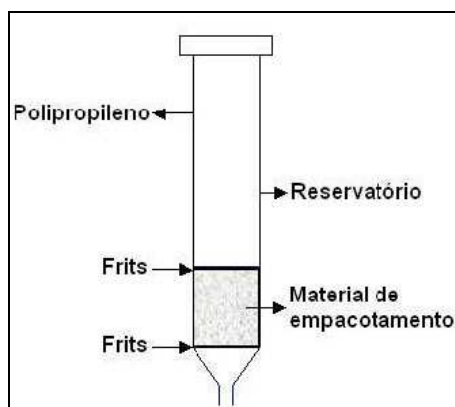


FIGURA 12 - CARTUCHO EMPREGADO NA EFS
FONTE: FALONE (2007)

As diferentes fases da extração em fase sólida que ocorrem no cartucho são apresentadas na Figura 13.

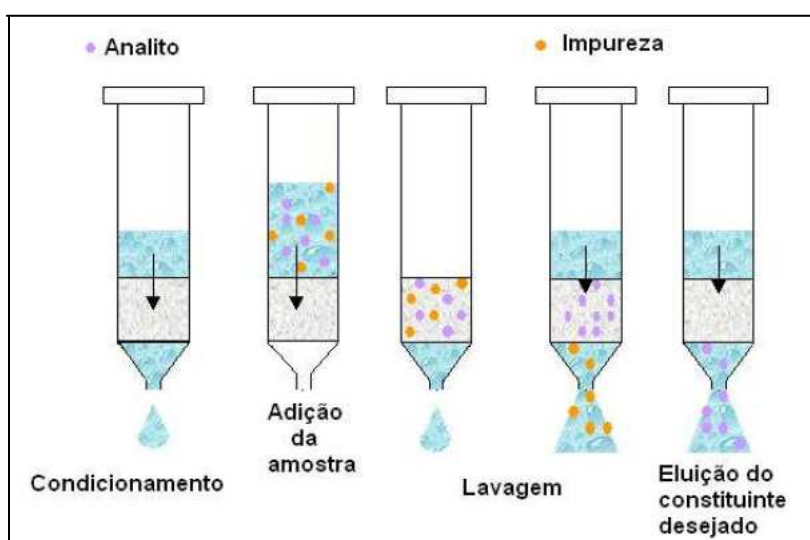


FIGURA 13 - FASES DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
FONTE: FALONE (2007)

O condicionamento consistiu na passagem seguida de solventes com polaridade crescente, com o objetivo de promover o arranjo das cadeias carbônicas do adsorvente, de forma a facilitar o acesso a estas cadeias e viabilizar uma recuperação eficiente do analito (PESEK E MATYSKA, 2000). A Figura 14 ilustra o arranjo das cadeias carbônicas do adsorvente em estado não condicionado (A), parcialmente condicionado (B) e totalmente condicionado (C).

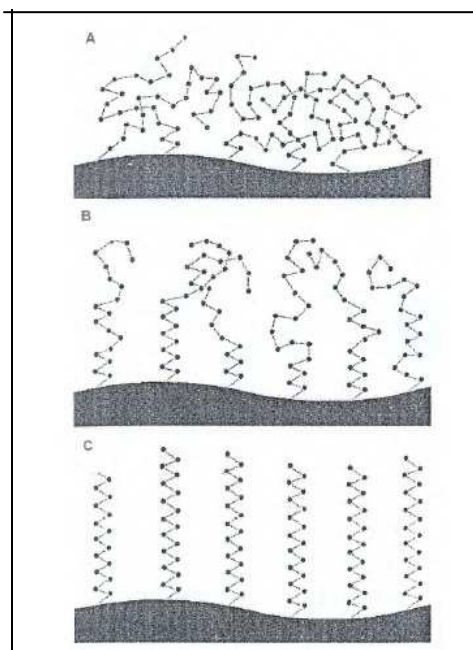


FIGURA 14 - ETAPAS DO CONDICIONAMENTO DE SÍLICA GEL LIGADA A OCTADESILCILANO (C18): SEM CONDICIONAMENTO (A), PARCIALMENTE CONDICIONADO (B), TOTALMENTE CONDICIONADO (C)

FONTE: PESEK E MATYSKA (2000)

Conforme Figura 13, após o condicionamento do cartucho, foi realizada a passagem da amostra pelo adsorvente, onde ocorreu a retenção dos HSFs e de outras substâncias com afinidade a esse (BELFROID *et al.*, 1999; INGRAND *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2006). Após a passagem da amostra, é realizada a lavagem do adsorvente para a liberação das substâncias indesejáveis retidas e, finalmente, a eluição dos HSFs com um solvente adequado.

A técnica de EFS foi utilizada na determinação de HSFs tanto nas amostras de água superficial quanto de sedimento. Entretanto, até que o método fosse definido, diversos testes foram realizados para a definição do melhor procedimento de extração, purificação e concentração de HSFs. Estes testes serão apresentados na sequência deste trabalho.

Matriz: Águas Superficiais

Para extração, purificação e concentração de HSFs em águas superficiais foram avaliados três procedimentos analíticos, conforme Tabela 04. A etapa preliminar à extração foi a filtração de um litro da amostra em membrana de éster de celulose (0,45µm de porosidade). A amostra selecionada para este teste foi coletada no ponto IG-02, por tratar-se de um local que recebe influência de uma grande parte da área estudada, conforme descrito no item 5.1 – Caracterização da Área de Estudo.

TABELA 04 - PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS TESTADOS PARA EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE HSFs EM ÁGUA SUPERFICIAL

	Procedimento 1	Procedimento 2	Procedimento 3
Referência	Falone (2007), Raimundo (2007)	Yamamoto <i>et al</i> (2006)	Lopez (2007)
Preparo da amostra	Redução do pH para 3,0 e Filtração	Redução do pH para 3,0 e Filtração	Filtração
Cartucho	C18 (6mL, 1g)	C18 e Florisil (6mL, 1g)	C18 (6mL, 1g)
Condicionamento	5 mL:metanol, água e sç HCL pH 3,0.	5mL: DCM : Metanol (80:20) e DCM:Hexano (1:1)	5mL: hexano, acetona, metanol, água (pH 3,0)
Lavagem do cartucho	10mL de água ultrapura	10mL de hexano : DCM (1:1)	10 mL de metanol:água (1:1)
Vazão	8-10mL/min	10-12 mL/min	8-10mL/min
Secagem do Cartucho	Nitrogênio	---	Nitrogênio
Eluição	10 mL de Acetonitrila	8 mL de DCM : Metanol (80:20)	10 mL de Acetona
Secagem do Extrato	Rotaevaporador	Nitrogênio	Rotaevaporador
Redissolução	1 mL de metanol	1mL de metanol	1mL de metanol

FONTE: O AUTOR

Os cartuchos C18 e Florisil utilizados, possuem capacidade de 6 mL, 1000mg de adsorvente e são provenientes da Agilent Technologies. A extração e a concentração foram realizadas sob vácuo por meio da fixação dos cartuchos em um sistema desenvolvido no laboratório (Figura 15). A passagem da amostra pelo cartucho ocorreu numa vazão entre 6 e 8 ml/min. O eluato obtido foi evaporado em rotaevaporador (Buchi, modelo R10) e redissolvido em 1,0 mL de metanol, com auxílio de ultrassom (Cleaner, modelo 1400), para completa redissolução. O extrato obtido foi armazenado a 4°C e protegido da luz, até a análise cromatográfica.

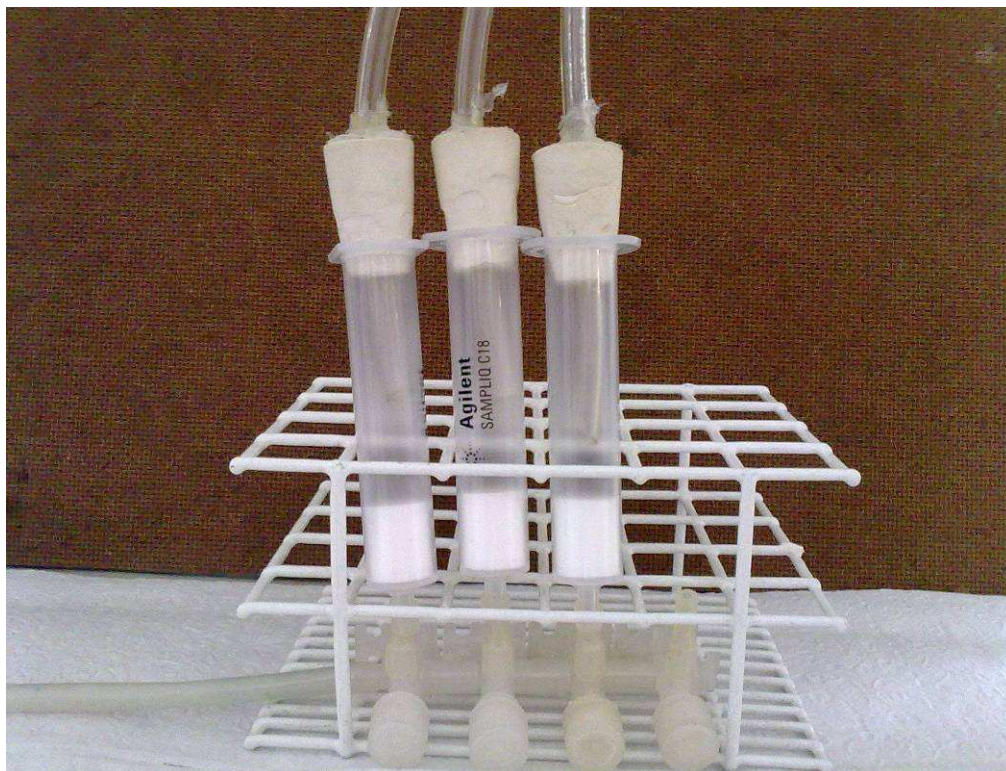


FIGURA 15 - SISTEMA UTILIZADO PARA A EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE HSFs EM ÁGUA SUPERFICIAL

FONTE: O AUTOR

Matriz: Sedimento

Para extração, purificação e concentração de HSFs em sedimento, foram testados três procedimentos analíticos, com variação de solventes, diferenciados pelo acréscimo de etapas. As etapas de cada procedimento são apresentadas na Tabela 05. Preliminarmente à extração, as amostras congeladas foram liofilizadas em liofilizador da Liotop, modelo L202, seguido de desagregação em almofariz, peneiramento e pesagem de 20g. A amostra selecionada para o teste foi coletada no ponto AT-02, por apresentar um dos valores mais baixos de matéria orgânica, caracterizando uma condição crítica de adsorção de HSFs.

No caso das amostras de lodo, como foi realizada amostragem única, após ter sido definido o método de análise de HSFs no sedimento, a mesma metodologia foi aplicada também nas amostras de lodo por tratar-se de matrizes semelhantes. Entretanto, a aplicação da metodologia de sedimento, a amostras de lodo possui limitações, principalmente em relação à faixa de concentrações a serem detectadas.

TABELA 05 - PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS TESTADOS PARA EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE HSFs EM SEDIMENTO

	Procedimento 1	Procedimento 2	Procedimento 3
Referências adaptadas	FALONE, 2007	BRAGA <i>et al</i> , 2005 HOUTMAN <i>et al</i> , 2006	LOPEZ DE ALDA <i>et al.</i> , 2002
ETAPA 1	Adição de 20mL de solvente (20g) 1-metanol 2-etanol 3-acetato de etila	Adição de 50mL de solvente (20g) 1- Hex:Acet (1:1) 2 - DCM: Acet. (3:1) 3 - Acetato de etila	Adição de 60mL de solvente (30+30) (20g) 1-Metanol: Acet (1:1) 2-DCM: Acet (3:1) 3-Hex: Acet (1:1)
ETAPA 2	Extração em Ultrassom por 15 min	Extração em Ultrassom por 20 min	Extração em Ultrassom por 5min após adição de cada alíquota de solvente
ETAPA 3	Centrifugação por 5 min a 5000 rpm	Filtração em papel de filtro (porosidade 14 µm)	Filtração dos extratos somados, em papel filtro.
ETAPA 4	Secagem dos extratos em rotaevaporador	Purificação em C18 (condic. e eluição igual para água sup)	Secagem dos extratos em rotaevaporador
ETAPA 5	Redissolução em 1 mL de metanol	Secagem do extrato em rotaevaporador	Redissolução em 2mL de Metanol: Acet (1:1) + 18 mL de água
ETAPA 6	---	Redissolução em 0,5mL de metanol	Purificação em C18 (condic e eluição igual para água sup)
ETAPA 7	---	---	Secagem do extrato em rotaevaporador
ETAPA 8	---	---	Redissolução em 0,5mL de metanol

FONTE: O AUTOR

NOTA: Acet: Acetona, Hex: Hexano, DCM: Diclorometano, Condi: Condicionamento, Sup: Superficial

Por meio da relação entre as concentrações de HSFs no sedimento e na água, dos pontos monitorados, foram calculados os valores do coeficiente de partição (K_d). Através da normalização dos valores de K_d , pelos teores de carbono orgânico total no sedimento, foram obtidos os valores de K_{oc} , com o objetivo de avaliar a capacidade de sorção dos HSFs à fração sólida, considerando as suas propriedades físico-químicas e as características químicas e limnológicas do sistema sedimento/água, na área de estudo.

3.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Conforme já mencionado, a validação é uma confirmação da eficiência do método utilizado para a determinação dos analitos pesquisados, sendo realizada após a otimização do método quando ocorre a definição deste. Convém salientar que não existe um modelo definido ou específico para sistemas de validação, sendo necessário ajustar e adequar às melhores condições (LEITE, 1996). Neste trabalho, foi realizada a validação em laboratório, sendo selecionados todos os parâmetros de validação exigidos pela ANVISA (2003) e INMETRO (2003) e a verificação do sistema cromatográfico de acordo com USFDA (2001).

Conformidade do Sistema Cromatográfico

Após definição das condições cromatográficas a serem utilizadas (modo de eluição, FM, fluxo e comprimento de onda), foi injetado 10 vezes um padrão analítico de 500µg/L, contendo todos os HSFs pesquisados, a fim de avaliar a conformidade do sistema cromatográfico, ou seja, as condições do equipamento e da coluna cromatográfica. Os parâmetros utilizados para esta avaliação foram: resolução, fator de alargamento dos picos e número de pratos teóricos.

Estabilidade

Para cada coleta, foi determinada uma nova curva analítica e a injeção dos extratos das amostras foi realizada em no máximo 15 dias após a extração, com exceção dos extratos de progesterona (PG) da primeira coleta (fev/2009), os quais permaneceram por 2 meses a 4°C até serem injetados.

A estabilidade dos HSFs por até um mês a 4°C, protegidos da luz, foi comprovada em estudos realizados por Raimundo (2007). Entretanto, para a verificação da estabilidade dos extratos, após dois meses, os extratos das amostras coletadas na quarta coleta (ago/09) foram reinjetados para determinação da PG e os resultados foram comparados com a injeção logo após a extração. Para esta situação, foi considerado como limite da variação entre os resultados o valor de 5%, estabelecido pela ANVISA (2003), como limite da variação da precisão, para determinação de fármacos em medicamentos.

Linearidade e Faixa de Aplicação

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica, a partir de um conjunto de medições experimentais, pode ser efetuada, usando o método matemático conhecido como regressão linear. A partir dos pontos da curva analítica foi possível calcular

o coeficiente de correlação (R), sendo que quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (FALONE, 2007). Buscou-se, uma relação linear entre a concentração ou quantidade e sinal analítico a cada campanha de amostragem, embora as relações não-lineares também sejam normalmente aceitas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Em relação à faixa de aplicação, em cada campanha de amostragem, a nova curva analítica injetada foi determinada de acordo com os limites inferior e superior das concentrações das amostras. A curva analítica foi feita utilizando-se padronização externa, sendo empregada uma solução estoque concentrada de 500mg/L, preparada a partir de padrões sólidos, em metanol. A partir desta solução estoque, foi preparada uma solução de 50 mg/L e a partir desta, foram preparadas as soluções de trabalho.

Seletividade

Neste trabalho, a seletividade foi avaliada de duas formas. A primeira foi através da comparação da matriz isenta do analito de interesse e a matriz fortificada com o analito (padrão); para este caso, nenhum outro composto deve eluir no tempo de retenção do analito de interesse. A outra forma é a avaliação com o detector DAD (arranjo de diodos) podendo também ser utilizado detector de massa, sendo ambos capazes de comparar o espectro do pico obtido na separação com o espectro de um padrão, indicando a presença de um composto puro (RIBANI *et al.*, 2004, ARAÚJO, 2006).

Neste trabalho, foram utilizadas as duas formas de avaliação da seletividade. Para a água foi utilizada a amostra coletada no ponto IG-02 (fortificação de 1µg/L), para o sedimento foi selecionado o ponto AT-03 (fortificação de 25µg/kg), já para o lodo, o teste de recuperação foi aplicado na amostra proveniente do tratamento anaeróbio (fortificação de 100µg/kg).

Sensibilidade

Assim como a linearidade, a sensibilidade também foi verificada a cada curva analítica feita a cada nova campanha de amostragem, sendo expressa pela inclinação da curva analítica, conforme equação apresentada.

Precisão

Neste trabalho, foram avaliadas a repetitividade (mesmo dia) e a precisão intermediária (dias diferentes). O procedimento adotado foi a injeção de um padrão analítico de 5 mg/L, para um número de seis repetições em três dias diferentes.

Exatidão

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e a realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2003). O uso de materiais de referência, quando disponíveis, é preferível por apresentar reconhecimento internacional, entretanto, devido ao seu alto custo, seu uso torna-se limitado. Assim, a exatidão foi avaliada através de ensaio de recuperação, método mais utilizado para validação em processos analíticos. O ensaio de recuperação está relacionado com a exatidão e reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A recuperação consistiu na “fortificação” da amostra, isto é, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação, na amostra, da concentração do analito adicionado (BRITO *et al.*, 2001).

Neste trabalho, a exatidão teve por finalidade avaliar a eficiência da extração em fase sólida. Para o teste de recuperação em água foi utilizada água deionizada, já para o sedimento, devido a dificuldade na obtenção de uma amostra isenta de HSFs, foi escolhida uma amostra coletada no ponto AT-03, e esta permaneceu por aproximadamente dois meses à temperatura ambiente. De acordo com Jurgens, Williams E Johnson (2002), a degradação completa de HSFs ocorre entre 20 e 40 dias. Assim, após dois meses, considerou-se uma completa degradação de todos os HSFs presentes na amostra.

É importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações (RIBANI *et al.*, 2004). Por esse motivo, a recuperação foi avaliada na faixa de concentração esperada para os compostos de interesse, através da fortificação em nível baixo (água: 1,0 µg/L, sedimento: 5 µg/kg), médio (água: 5 µg/L, sedimento: 50 µg/kg) e alto (água: 12 µg/L, sedimento: 100 µg/kg) dos HSFs pesquisados.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção no equipamento foi estimado com base na relação de três vezes o ruído da linha de base. Já o limite de quantificação, foi obtido pela análise de soluções, contendo concentrações decrescentes dos HSFs até o menor nível determinável com precisão, exatidão e linearidade (ANVISA, 2003). A partir do LQ do equipamento, foi calculado o limite de quantificação de cada método analítico, considerando o fator de concentração dos HSFs de cada matriz.

3.4 OUTRAS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Para um melhor entendimento das características da bacia a ser estudada, foram realizadas algumas análises físico-químicas nas amostras de água, no Laboratório de Pesquisa em Resíduo – LEPER da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR e de sedimento, no Laboratório de Engenharia Ambiental Prof. Francisco Borsari Netto - LABEAM da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Nas amostras de água, foram medidos em campo o pH (WTW, modelo 330i/SET), a condutividade (Schott, modelo Handylab LF1), a turbidez (Hach, modelo 2100P), a temperatura e o oxigênio dissolvido (Schott, modelo Handylab OX12SET). Em laboratório, foram feitas as seguintes determinações em amostras *in natura* e amostras previamente filtradas em membranas Millipore de acetato de celulose (0,45 µm). As análises foram realizadas de acordo com procedimento descrito em APHA (1998).

- Fósforo total e dissolvido: foram determinados após a digestão com os ácidos $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, aplicando-se o método espectrofotométrico após reação com molibdato/acido ascórbico. O ortofosfato foi determinado na amostra filtrada, após reação com molibdato/acido ascórbico (APHA, 1998).
- Formas de nitrogênio: o nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método do Nitroprussiato/Fenol. O nitrito e o nitrato foram determinados pelo método da Sulfanilamida/Naftil, sendo o nitrato anteriormente reduzido a nitrito em coluna de cádmio (APHA, 1998). O nitrogênio total foi determinado após digestão da amostra, com persulfato de potássio em meio básico. Dessa forma, todo nitrogênio presente na amostra foi oxidado a nitrato e, posteriormente, reduzido a nitrito em coluna de cádmio e determinado também pelo método da Sulfanilamida/Naftil. O nitrogênio orgânico dissolvido foi obtido pela diferença entre a concentração do nitrogênio total e a concentração do nitrogênio inorgânico (amoniacal, nitrito e nitrato) (APHA, 1998).
- Cloreto: foi utilizado o método titulométrico com nitrato de mercúrio II (APHA, 1998).
- Sólidos Suspensos e Dissolvidos: foram determinados pelo método gravimétrico, descrito em APHA (1998).
- Demanda Química de Oxigênio: após digestão, em sistema fechado, da amostra com ácido sulfúrico e sulfato de prata/sulfato de mercúrio, como catalisador, a demanda química de oxigênio foi determinada pelo método colorimétrico (APHA, 1998).
- Carbono Orgânico Dissolvido (COD): foi determinado, empregando-se o equipamento TOC 5000-A Shimadzu.

- Metais: foi determinado em amostras filtradas, após sua digestão, (ácido nítrico) sob aquecimento, conforme procedimento descrito em (APHA, 1998). Após digestão foi feita a leitura em espectrofotômetro de absorção atômica GBC, modelo Avanta
- Fluorescência: as análises de fluorescência foram realizadas no espectrofotômetro de fluorescência *Fluorescence Spectrophotometer* Hitachi, modelo F-4500. Foram obtidos os espectros de emissão (λ Excitação de 314 e 370 nm) na região de 300 a 600 nm e espectros de varredura sincronizada com excitação de 250 a 600 nm ($\Delta\lambda = 18$ nm), aplicando 240 nm min⁻¹, fenda de 5 nm, cubeta de quartzo de 1 cm e água ultrapura como branco.
- Ultravioleta e Visível: as análises da absorbância na região do visível e ultravioleta (UV-VIS) foram realizadas em um espectrofotômetro da Shimadzu. A faixa analisada foi de 200 a 700 nm.

Nas amostras de sedimento, foram realizadas análises granulométricas, baseadas na metodologia descrita pela ABNT (1968) – Análise Granulométrica de Solos (Método Brasileiro), sendo utilizado o método combinado de análise por sedimentação (densímetro) e por peneiramento, para obtenção de frações de areia, silte e argila; análises de teores de matéria orgânica pelo método gravimétrico descrito em APHA (1998) e a partir destes teores de matéria orgânica, foram estimados os teores de carbono orgânico total no sedimento, de acordo com Jackson (1964) *apud* Bianchi *et al.*, (2004).

Para o atendimento da faixa de detecção aplicável de cada método, muitas amostras foram diluídas, principalmente para a análise de nitrogênio amoniacal, fósforo e sólidos suspensos, os quais apresentam valores máximos aplicáveis de 2mg/L; 1,3mg/L e 200mg/L respectivamente.

3.5 CAMPANHAS AMOSTRAIS

As campanhas amostrais foram realizadas durante o período de fevereiro a outubro de 2009. Foram realizadas ao todo cinco campanhas, em intervalos de aproximadamente dois meses, exceto para três pontos (IT-01, CP-01 e IG-01) os quais não foi possível coletar amostra durante a segunda campanha (abril/09), resultando em apenas quatro amostragens.

Para a coleta de amostras de água, foi utilizada uma garrafa do tipo Van Dorn de 5 L. Após coletadas, as amostras foram preservadas a 10°C, em caixas térmica e transportadas imediatamente ao laboratório, onde foram armazenadas sob refrigeração a 4°C. Para análises de nitrogênio, as amostras foram preservadas com a adição de 1mL de ácido sulfúrico concentrado conforme procedimento estabelecido por APHA (1998). Para

coleta, foram utilizados frascos de vidro âmbar, exceto na preservação com ácido sulfúrico, na qual foram utilizados frascos plásticos. As amostras de água foram coletadas a, no máximo, 50cm de profundidade.

Para a coleta de amostras de sedimento, foi utilizada uma draga de Petersen modificada. Após coletadas, as amostras de sedimento foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas e congeladas.

A coleta das amostras foi realizada próximo à margem do rio (pontos IG-01, IG-02, AT-02, AT-03) e ponto central: utilizando barco (ponto CP-01) e sobre uma ponte (ponto AT-01 e IT-01). Os locais de coleta estão apresentados nas Figuras 16 a 22.



FIGURA 16 - PONTO IG-01 (rio Iguaçu após foz do rio Palmital)

FONTE: O AUTOR



FIGURA 17 - PONTO AT-01 (montante da ETE Atuba Sul)

FONTE: O AUTOR



FIGURA 18 - PONTO AT-02 (imediatamente a montante da saída da ETE Atuba Sul)

FONTE: O AUTOR



FIGURA 19 - PONTO AT-03 (saída da ETE Atuba Sul).

FONTE: O AUTOR



FIGURA 20 – PONTO IT – 01 (rio Itaqui).

FONTE: O AUTOR.



FIGURA 21 - PONTO CP-01 (Canal Paralelo a jusante da foz do rio Itaquí)
FONTE: O AUTOR



FIGURA 22 - PONTO IG-02 (rio Iguaçu após confluência com rio Atuba)
FONTE: O AUTOR

A vazão, no momento da coleta, foi obtida por meio de três métodos diferentes. Nos pontos IG-01, IT-01 e CP-01 foi medida com molinete. Nos pontos localizados no rio Atuba (AT-01, AT-02 e AT-03) a vazão foi estimada a partir de dados provenientes da estação telemétrica Autódromo (cód:65007046) em relação à área de drenagem e no ponto IG-02, foi obtida por leitura de nível e curva de descarga.

As amostras de lodo da ETE foram coletadas com o auxílio de uma pá, em três locais diferentes após: tratamento anaeróbio, tratamento físico-químico e processo de calagem. Após as coletas, as amostras de lodo tiveram o mesmo tratamento das amostras de sedimento.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para um melhor entendimento e apresentação dos resultados, este capítulo foi dividido em três partes: 4.1 – adaptação e otimização dos métodos analíticos; 4.2 – validação dos métodos analíticos e 4.3 – campanhas amostrais.

4.1 ADAPTAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Esta primeira etapa do trabalho consistiu na adaptação e otimização dos métodos analíticos para a determinação de HSFs em amostras de água superficial e sedimento.

Separação Cromatográfica

De acordo com a figura 23, a separação cromatográfica mais eficiente dos HSFs pesquisados foi obtida por eluição isocrática, com proporção de ACN de 50% para os estrogênios (E1, E2 e EET) e de 90% para a PG. Na eluição com o gradiente 1 houve uma provável co-eluição de todos os compostos após 20 min de corrida, enquanto no gradiente 2, houve uma instabilidade da linha de base após 30min, prejudicando o pico da PG. Dentre as proporções de ACN testadas na eluição isocrática, observou-se que com 30% de ACN não ocorre a eluição dos picos antes de 30 min, tornando a corrida cromatográfica muito longa, já com 70% de ACN ocorre uma perda de resolução entre os estrogênios e com 90% de ACN ocorre uma co-eluição de todos os estrogênios, eluindo de forma eficiente apenas a PG.

Em relação à otimização do fluxo da fase móvel, foram testados de 0,8 a 2,0mL/min. Para os estrogênios, entre 0,8 e 1,0 mL/min, não houve uma diferença significativa na resolução dos picos e o tempo de retenção do último analito eluído (E1) foi de 13,30 min. No fluxo de 1,4 mL/min, houve um aumento significativo na resolução dos picos (aprox. 13%), enquanto no fluxo de 2,0mL/min houve uma redução de aproximadamente 58% na resolução. Sendo assim, o melhor fluxo para a fase móvel com 50% de ACN foi de 1,4 mL/min e o tempo de retenção do último analito de 10,31 min (temperatura 21 C).

Para a progesterona, entre 0,8 e 1,0 mL/min, não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados. Entretanto, após 1,0 mL/min houve um decréscimo significativo no número de pratos teóricos (40%). Assim, o fluxo de 1,0 mL/min foi definido para a progesterona e o tempo de retenção foi de 4,6 min.

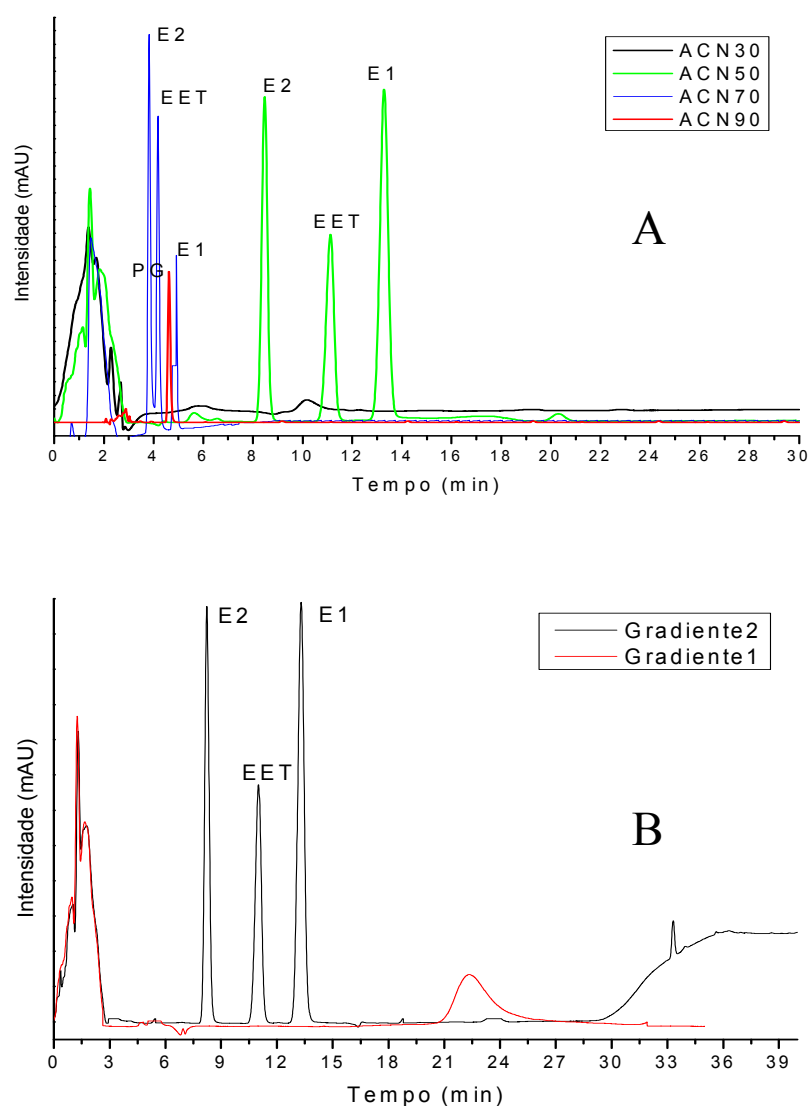


FIGURA 23 – TESTES DE ELUIÇÃO DA FASE MOVEL: MODO ISOCRÁTICO (A) E COM GRADIENTES (B) (λ :200nm, FLUXO DE 1mL/min)

FONTE: O AUTOR

Para a definição do comprimento de onda de maior absorbância, foram analisados os espectros de absorção de UV, fornecidos pelo software do HPLC, e, através destes, foi observado que para os estrogênios a maior absorbância ocorre a 200nm, enquanto que para a progesterona a 241nm. Entretanto, ao analisar os espectros de absorção de UV das amostras foi observado que em 200nm existe uma grande quantidade de compostos que também absorvem neste comprimento de onda e são eluídos na mesma faixa de tempo de retenção dos estrogênios, conforme ilustrado na figura 24, podendo, desta forma, interferir em sua análise. Assim, o comprimento de onda selecionado para a análise de estrogênios foi 280nm, onde a intensidade desta interferência é menor.

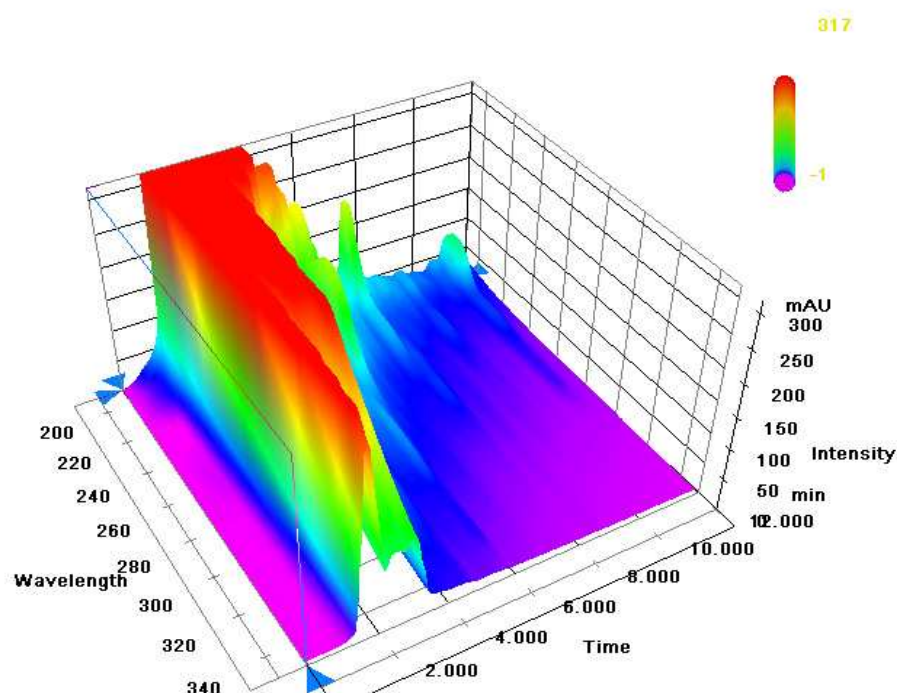


FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA EM TRÊS DIMENSÕES DO COMPRIMENTO DE ONDA, TEMPO DE RETENÇÃO E INTENSIDADE DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA, REFERENTE À AMOSTRA COLETADA EM OUT/09 NO PONTÔ AT-03

FONTE : O AUTOR

Extração e Concentração dos HSFs

Para amostras de água superficial, dentre os procedimentos apresentados na Tabela 04, o procedimento, contendo o conjunto de fatores (cartucho EFS; solventes para condicionamento, lavagem e eluição; vazão da amostra e secagem do cartucho EFS) que apresentou maior eficiência na extração, purificação e concentração dos estrogênios foi o procedimento 1, descrito a partir dos métodos utilizados por Raimundo (2007) e Falone (2007). Entretanto, para a progesterona apenas a passagem pelo cartucho EFS C18 e a lavagem com água, descritos no procedimento 1, não foi suficiente para eliminação de interferentes, ocorrendo co-eluição com outros compostos. Sendo assim, foi acrescentado ao procedimento 1, uma etapa de passagem de 0,5 mL do extrato eluído do cartucho C18 por um segundo cartucho Florisil, de acordo com Yamamoto *et al* (2004), após mistura com 2mL de água ultrapura.

Em relação à análise de HSFs em sedimento, os procedimentos citados na Tabela 05 correspondem a uma seqüência de melhoramentos do método de extração dos HSFs. O procedimento 1 não apresentou seletividade na extração destes compostos, sendo observado através da alteração do espectro de varredura de absorção de UV, a co-eluição com outros compostos. Assim, ao procedimento 2 foi substituída a centrifugação pela

filtração e foi adicionada a etapa de passagem da amostra por um cartucho de EFS C18, com o objetivo de purificar o extrato (Tabela 05). No entanto, após análise aplicando o procedimento 2, a eficiência de extração foi igual a zero, ou seja, nenhuma concentração de HSFs foi encontrada no extrato final. A ineficiência do procedimento 2 ocorreu devido à baixa afinidade do extrato que continha os HSFs extraídos do sedimento pelo cartucho de EFS, considerando que o cartucho era de fase reversa (FE menos polar que FM) e o extrato, um solvente orgânico. Assim, no procedimento 3 foi acrescentada uma etapa de evaporação do extrato após a filtração, seguida de redissolução em uma solução contendo água, com o objetivo de aumentar a afinidade dos HSFs pelo cartucho de EFS (Tabela 05). Dessa forma, o procedimento 3 contém o conjunto de fatores que apresentou a melhor eficiência na extração, purificação e concentração de HSFs em sedimento.

4.2 VALIDAÇÃO

Para a comprovação da eficiência do método de determinação de HSFs por HPLC/DAD, foi realizado o processo de validação que consistiu na verificação dos seguintes parâmetros: conformidade do sistema cromatográfico, linearidade e faixa de aplicação, seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Os resultados dos testes de validação foram avaliados de acordo com padrões estabelecidos em guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, disponibilizados por órgãos, tais como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), MAPA (Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e USFDA (*United States Food and Drug Administration*), além de artigos publicados sobre o assunto.

Conformidade com o sistema cromatográfico

Os resultados da avaliação do desempenho do equipamento e da coluna cromatográfica, após injeção do padrão de 500µg/L por 10 vezes, estão apresentados na Tabela 06. Todos os parâmetros avaliados encontram-se de acordo com o exigido pela USFDA (2001). A resolução apresentou valores acima de dois, indicando que os picos avaliados encontram-se suficientemente separados. A eficiência da coluna cromatográfica foi comprovada através dos valores observados para o fator de alargamento (<2), indicando uma baixa difusibilidade do analito. Esta eficiência da coluna também foi comprovada pelos valores do número de pratos teóricos, o qual segundo a USFDA (2001) devem ser maiores que 2000.

TABELA 06 - PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA CONFORMIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Composto	E2	EET	E1	PG
Tempo de Retenção	7,56	8,88	10,31	4,60
Resolução	3,643	5,196	3,724	-
Fator de Alargamento	0,283	0,357	0,432	0,176
Numero de Pratos	95.478	92.670	93.643	87.682

FONTE: O AUTOR

Estabilidade

A variação dos resultados das amostras coletadas em ago/09 injetadas após a extração e após dois meses de armazenamento dos extratos, foi de 11 a 23%. Assim, considerando o limite do coeficiente de variação de 5%, estabelecido pela ANVISA, para a determinação de fármacos, os resultados de progesterona, dos extratos das amostras da primeira coleta (fev/09) que foram injetados após dois meses da extração, foram descartados.

Linearidade e Faixa de Aplicação

As curvas construídas para cada coleta se mantiveram acima de 0,9917. Este valor foi o menor de R obtido para a curva padrão do E1. O critério mais rigoroso, para este parâmetro, foi estabelecido pela ANVISA (2003), que exige coeficientes acima de 0,99. Os coeficientes de correlação obtidos neste estudo encontram-se, portanto, em conformidade.

As faixas de aplicação utilizadas estão apresentadas na Tabela 07.

TABELA 07 - FAIXAS DE APLICAÇÃO UTILIZADAS NAS ANÁLISES DE HSFs EM ÁGUA SUPERFICIAL E SEDIMENTO

Hormônio	Água (µg/L)	Sedimento (µg/Kg)
E1 (Estrona)	100 – 2.000	100 – 2.000
E2 (17 β-Estradiol)	100 – 5.000	100 – 5.000
EET (17α-Etinilestradiol)	120 – 5.000	120 – 2.000
PG (Progesterona)	60 – 1.000	500 – 4.000

FONTE: O AUTOR

Seletividade

Neste trabalho, a seletividade foi avaliada de duas formas. A primeira foi através da comparação da matriz isenta de HSF com a matriz fortificada com cada um deles. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 25 para a água superficial e Figura 26 para sedimento, mostrando que os métodos analíticos são seletivos para a determinação de HSFs nestas matrizes.

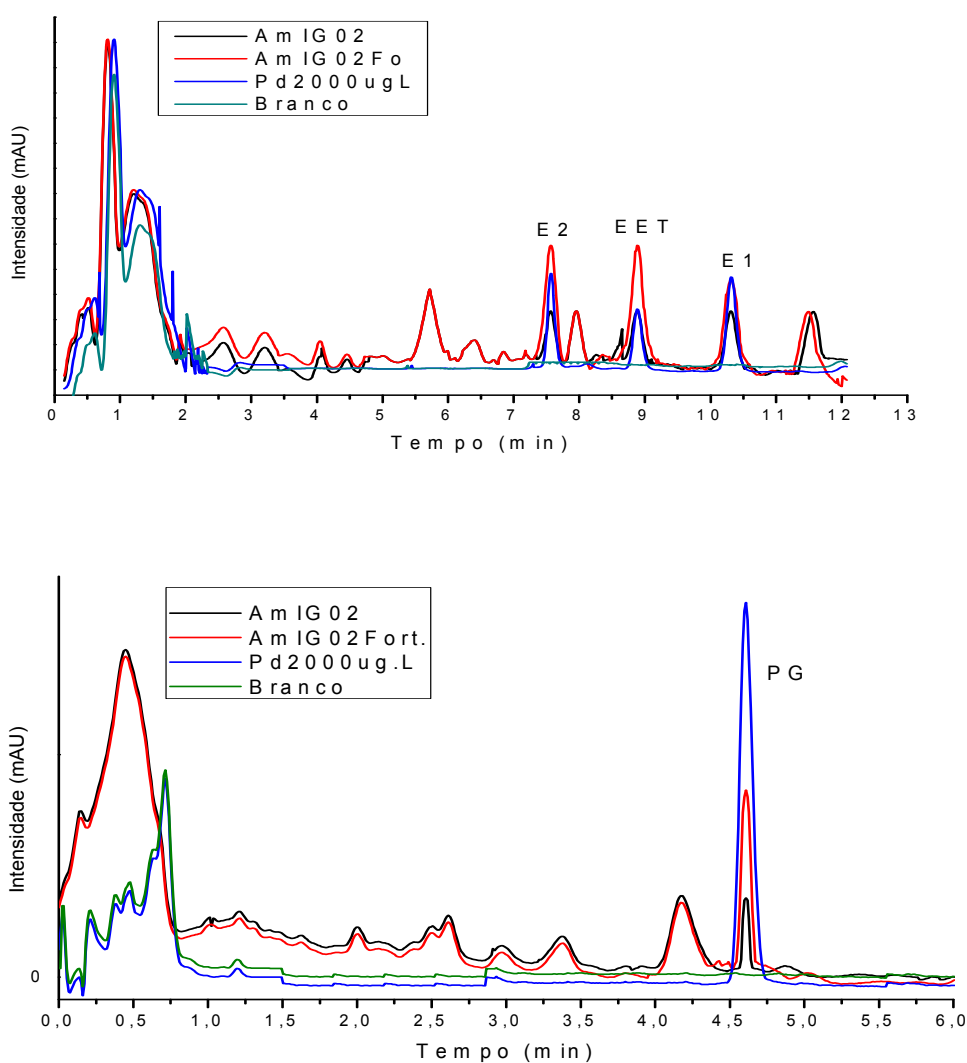


FIGURA 25 - CROMATOGRAMAS GERADOS NA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DE HSFs EM ÁGUA SUPERFICIAL

FONTE: O AUTOR

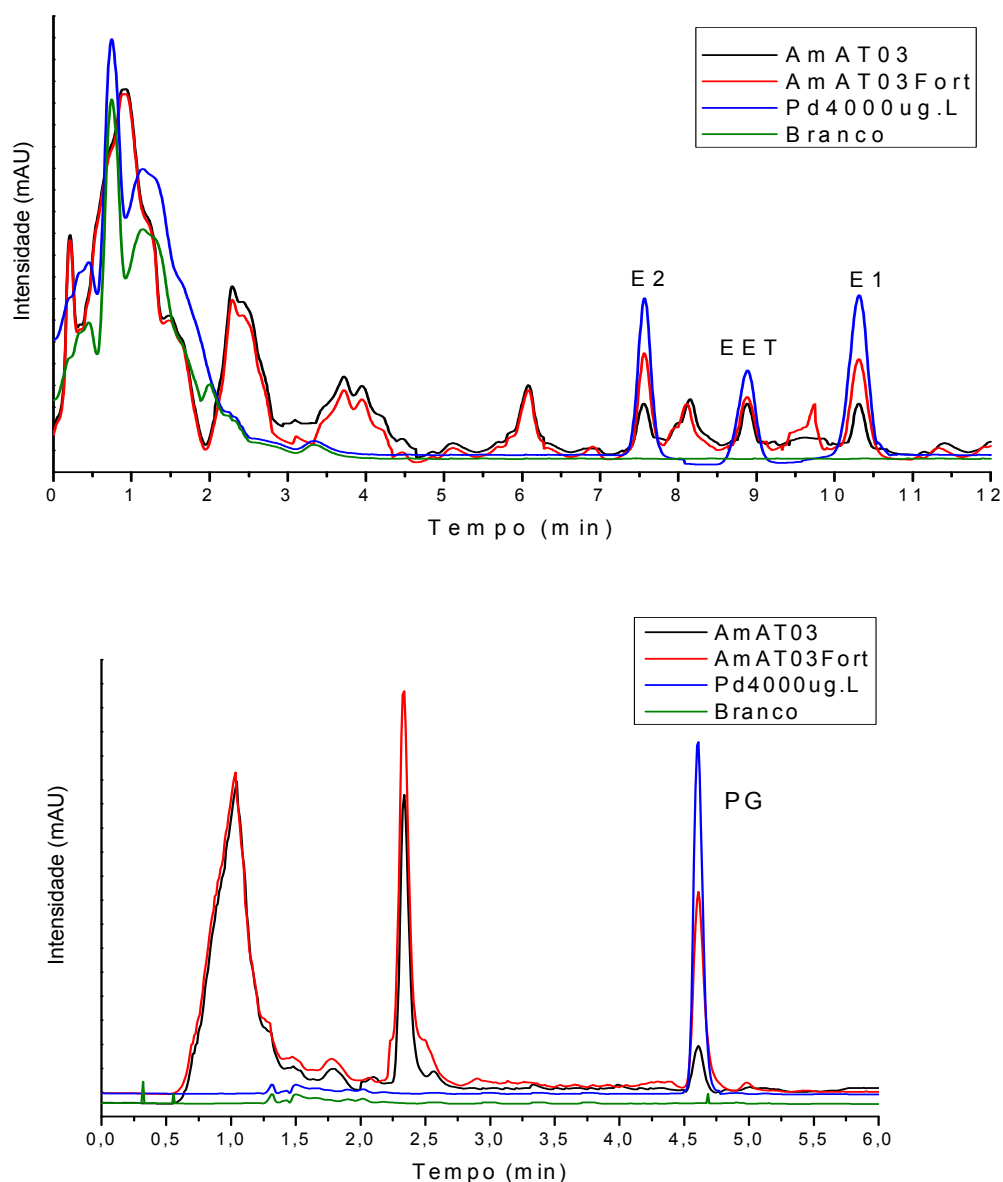


FIGURA 26 - CROMATOGRAMAS GERADOS NA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DE HSFs EM SEDIMENTO

FONTE: O AUTOR

Outra forma de avaliar a seletividade é através da identificação, no cromatograma, do espectro de absorção no ultravioleta de cada composto estudado. Este é um artifício que pode ser utilizado quando a determinação analítica é feita por detector de arranjo de diodos. A Figura 27 apresenta os espectros de absorção no ultravioleta de uma solução padrão, de um dos estrogênicos (E2) e da progesterona, provenientes de amostra de água superficial e de sedimento. Através desta comparação, foi possível comprovar a presença dos compostos pesquisados nas matrizes e a seletividade dos métodos analíticos.

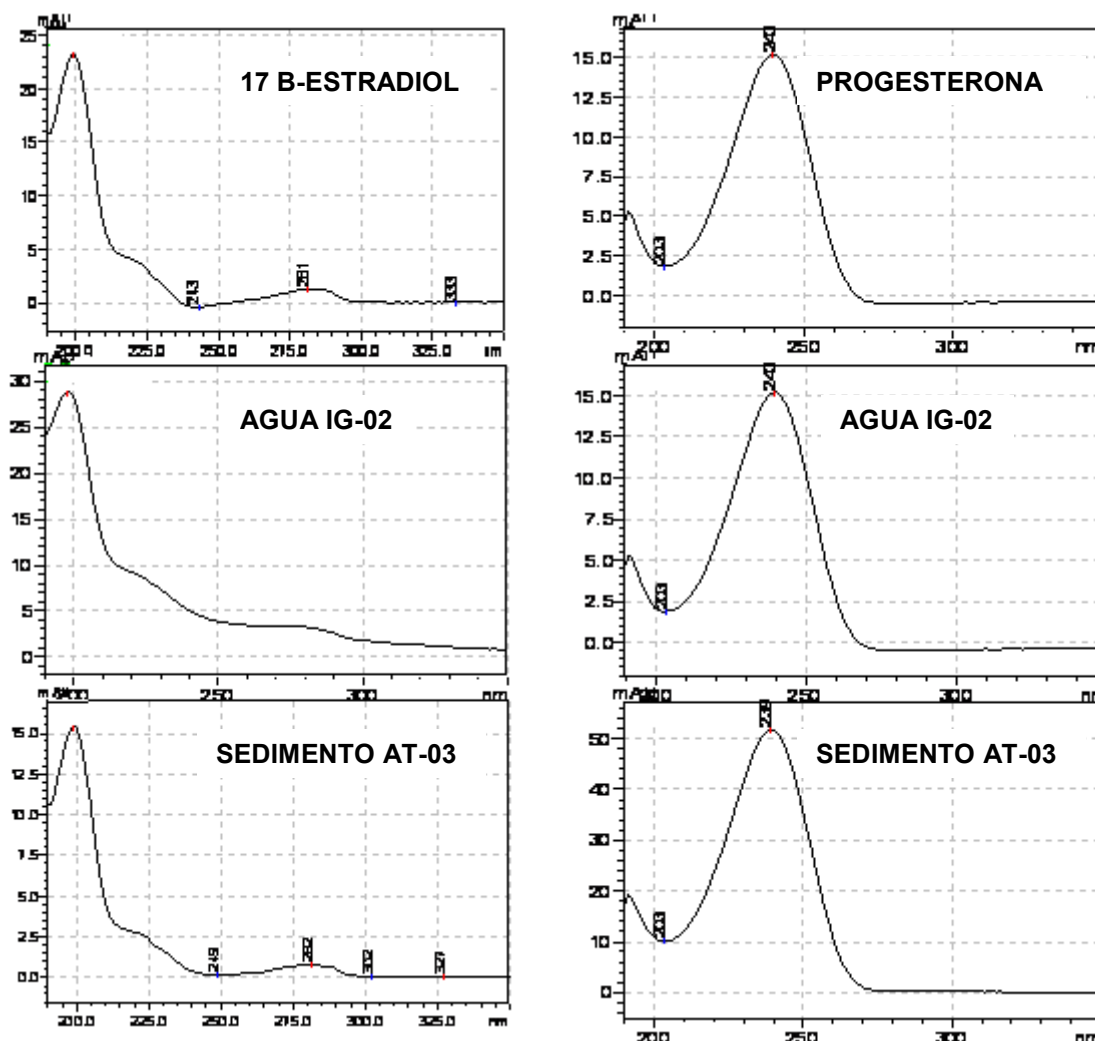


FIGURA 27 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DE UM DOS ESTROGÊNIOS (E2) E DA PROGESTERONA, PRESENTES NA SOLUÇÃO PADRÃO, EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL (PONTO IG-02) E EM AMOSTRA DE SEDIMENTO (PONTO AT-02) À DIREITA

FONTE: O AUTOR

Sensibilidade

Quando um método é sensível, uma pequena diferença na concentração do analito promove uma grande variação no sinal medido, garantindo que o método analítico seja capaz de detectar a variação no valor do sinal medido, causado por um pequeno acréscimo na concentração do analito. De acordo com a Figura 28, o composto que apresentou maior sensibilidade no método analítico proposto foi a PG, com um coeficiente de variação do fator resposta (Área/conc.) de 4,66%. Já a menor sensibilidade foi observada para o EET, com um coeficiente de 7,66%. Para o E1 e E2 foram observados coeficientes de variação do fator resposta de 5,43% e 5,01% respectivamente, valores estes, próximos aos obtidos por Lopez (2007) em estudos de validação, também utilizando CLAE/DAD.

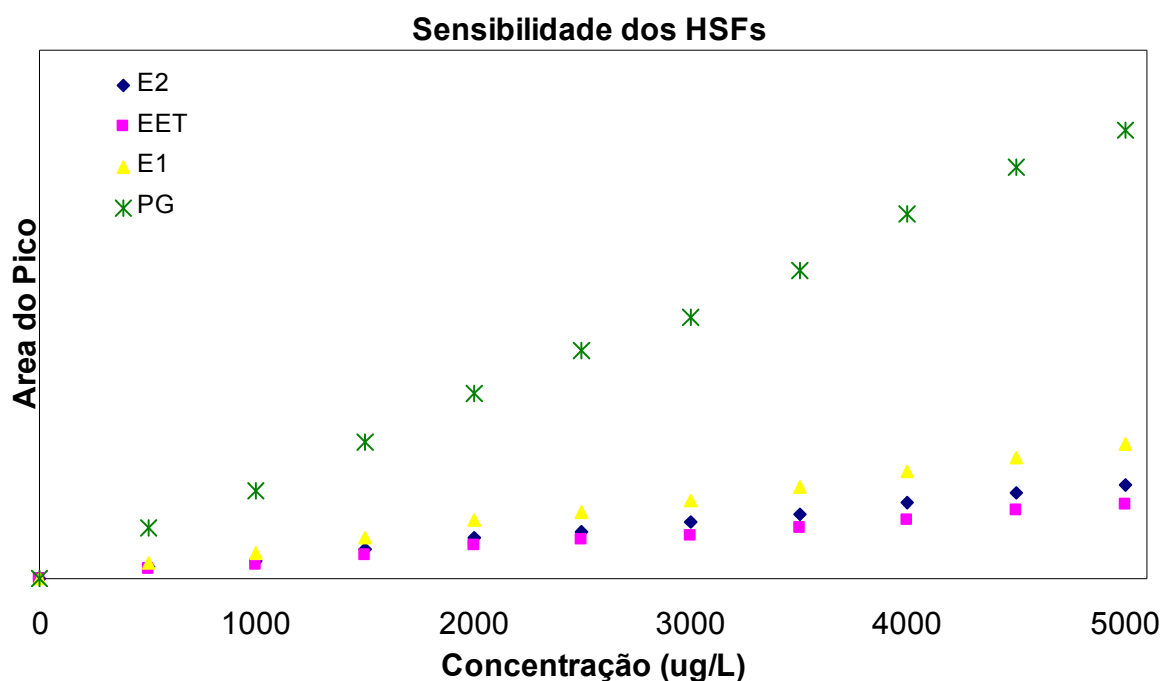


FIGURA 28 - CURVAS ANALÍTICAS DOS QUATRO HSFS PESQUISADOS

FONTE: O AUTOR

Precisão

A repetitividade e a precisão intermediária foram avaliadas através da injeção de uma solução padrão de 5mg/L por seis vezes em três dias diferentes. Para estas condições, o INMETRO (2003) prevê um coeficiente de variação de no máximo 20%. Segundo Wood (1999), para analitos em concentrações na faixa de ug/L (ppb, 10^{-9} %) a precisão aceitável considera coeficiente de variação de até 45%. Já a ANVISA (2003) não admite valores de CV superiores a 5% para a determinação de fármacos em medicamentos, porém, para a determinação destes em amostras mais complexas tais como soro, sangue ou plasma é permitido um CV de até 15% (ANVISA, 2003). Os resultados do coeficiente de variação (CV) estão apresentados na Figura 29, juntamente com os limites de CV estabelecidos pela ANVISA (2003) e INMETRO (2003).

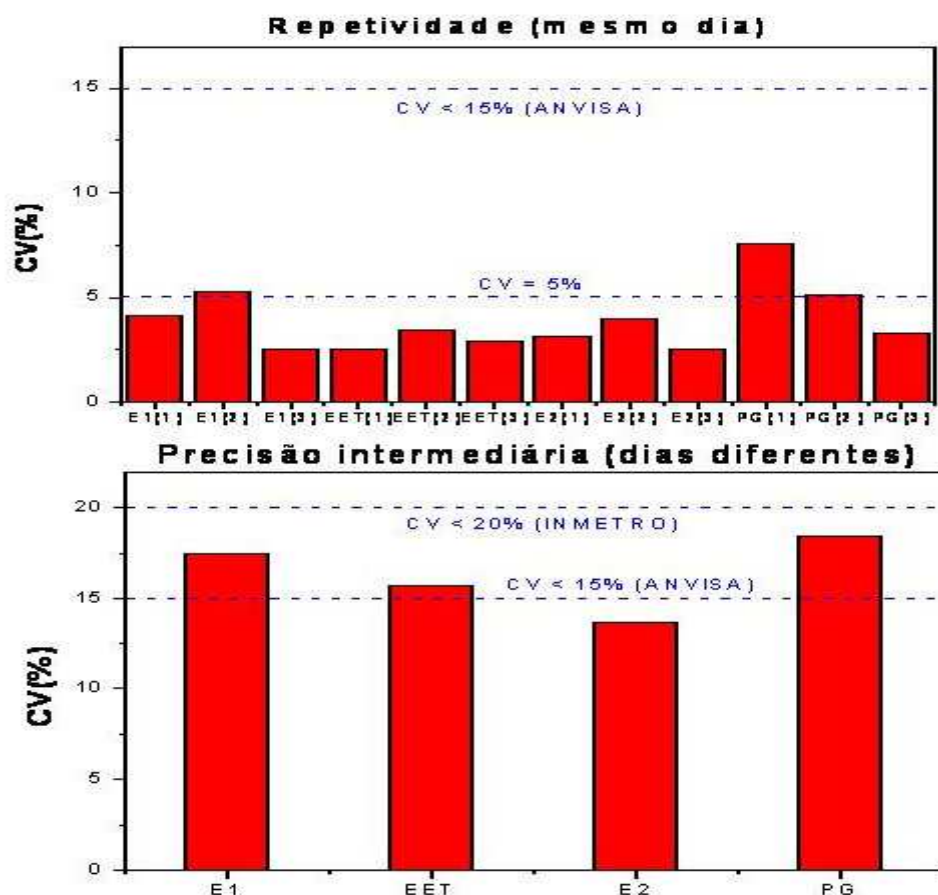


FIGURA 29 - REPETIBILIDADE DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA UMA SOLUÇÃO PADRÃO DE 5000 µg/L DOS QUATRO HSFs PESQUISADOS, EXPRESSA POR MEIO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV) PARA UM NÚMERO DE SEIS REPETIÇÕES REALIZADAS EM UM MESMO DIA (REPETITIVIDADE) E EM DIAS DIFERENTES (PRECISÃO INTERMEDIÁRIA)

FONTE: O AUTOR

Os coeficientes de variação da repetitividade (mesmo dia) encontram-se inferiores ao limite estabelecido pela ANVISA (2003) para medicamentos (CV = 5%). Já os coeficientes de variação da precisão intermediária (dias diferentes) encontram-se acima do limite estabelecido pela ANVISA (2003) para amostras complexas (soro, sangue, plasma e etc). Entretanto, apesar de violarem o limite da ANVISA (2003), os coeficientes de variação obtidos da precisão intermediária mantiveram-se abaixo do limite de 20%, estabelecido pelo INMETRO (2003). O motivo do aumento dos coeficientes de variação nas medições em dias diferentes, provavelmente, esteve associado à variação da temperatura no local da análise, a qual interfere na viscosidade do solvente e, conseqüentemente, na repetição dos resultados. Observou-se pelos resultados de CV, que o composto mais afetado foi a progesterona, apresentando os maiores valores. Porém, apesar de ocorrer um aumento nos CV, nas medições em dias diferentes, estes se mantiveram dentro dos limites considerados satisfatórios.

Exatidão

Neste trabalho, a exatidão teve por finalidade avaliar a eficiência da extração de HSFs, em fase sólida, nos dois métodos definidos (água superficial e sedimento). Considerando que a eficiência do método varia em função da concentração do analito, foram feitas fortificações em três níveis de concentração: baixo, médio e alto dos HSFs pesquisados nas matrizes água superficial e sedimento. Para a matriz lodo de ETE foi realizado ensaio de recuperação em apenas um nível de concentração. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 08.

De acordo com Brito *et al* (2003), para concentrações do analito na amostra, menores ou iguais a $10^{-8}\%$ (ppb), a faixa aceitável de recuperação está entre 40-120%. Para a ANVISA (2003), em análise de fármacos e medicamentos, a concentração experimental deve estar entre 80-120% da concentração teórica. Já segundo o Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas–GARP (1999), somente valores entre 70 e 120% são aceitáveis.

Neste estudo, as porcentagens de recuperação variaram de 59 a 112%. Para a matriz água superficial, apenas o E1 apresentou recuperação fora da faixa aceitável, de 70 a 120%, estabelecida pelo GARP (1999). Para a matriz sedimento, apenas as recuperações em nível médio (50µg/kg) e alto (100µg/kg) de concentração, encontraram-se na faixa do GARP, todavia, estão de acordo com a faixa estabelecida por Brito *et al* (2003) de 40-120%. Em relação à matriz lodo de ETE, todos os valores obtidos estão de acordo tanto com a faixa considerada aceitável pelo GARP (1999) quanto pela ANVISA (2003).

TABELA 08 - RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Composto	Lodo (%)	Sedimento(%)				Água(%)	
	100µg/kg	2,5µg/kg	50µg/kg	100µg/kg	1 µg/L	5µg/L	12µg/L
E1	85	59	78	81	67	106	72
E2	81	62	81	76	78	70	95
EET	93	65	77	82	72	93	82
PG	112	87	95	103	74	102	110

FONTE: O AUTOR

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de quantificação e detecção dos HSFs, no equipamento (HPLC) e nas amostras, estão apresentados na Tabela 09. O limite de detecção no equipamento foi estimado com base na relação de três vezes o ruído da linha de base. Já o limite de quantificação no equipamento foi obtido pela análise de soluções contendo concentrações decrescentes dos HSFs até o menor nível determinável com precisão, exatidão e

linearidade. A partir do LQ do equipamento, foi calculado o limite de quantificação de cada método analítico, considerando o fator de concentração dos HSFs em cada matriz.

TABELA 09 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HSFs DO EQUIPAMENTO (HPLC) E DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE CADA MATRIZ

Composto	Limites do Equipamento		Limites dos Métodos	
	LD _{HPLC} (ng/L)	LQ _{HPLC} (µg/L)	LQ _{ÁGUA} (µg/L)	LQ _{SED./LODO} (µg/kg)
17 β-Estradiol	30	100	0,10	2,5
17α-Etinilestradiol	42	120	0,12	3,0
Estrona	30	100	0,10	2,5
Progesterona	9	60	0,06	1,5

FONTE: O AUTOR

Em relação ao limite de quantificação do equipamento, observou-se que não houve diferença de valores entre os estrogênios, enquanto a progesterona apresentou um limite mais baixo (Tabela 09), devido à sua maior sensibilidade ao detector UV, conforme observado anteriormente (Figura 28). O menor limite de quantificação observado para a progesterona, está ligado ao uso do comprimento de onda de máxima absorção no ultravioleta para este composto, proporcionando ao método analítico a capacidade de detectar menores concentrações. Em contrapartida para os estrogênios não foi possível utilizar na análise o comprimento de onda de maior absorção no ultravioleta devido a presença de diversos outros compostos de polaridade semelhante e que absorvem no mesmo comprimento de onda. O uso de comprimento de onda mais seletivo, porém de menor absorção no ultravioleta, acarreta em maiores limites de quantificação.

4.3 CAMPANHAS AMOSTRAIS

4.3.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA

Considerando a ligação dos compostos pesquisados com as atividades antropogênicas da região em estudo, foram analisadas algumas variáveis limnológicas, conforme apresentado na Tabela 10, para obter um cenário da qualidade da água durante o período de coleta.

TABELA 10 - VALORES MÉDIOS DAS VARIÁVEIS LIMNOLÓGICAS

Ponto/Parâmetro	IG-01	AT-01	AT-02	AT-03	IG-02	IT-01	CP-01
N.Amoniacal (mg/L)	3,58 (±2,20)	4,48 (±2,51)	16,45 (±8,55)	24,82 (±8,12)	8,62 (±6,72)	0,32 (±0,49)	0,19 (±0,17)
N.Orgânico (mg/L)	4,99 (±3,99)	19,63 (±20,83)	36,79 (±69,57)	25,43 (±31,72)	5,17 (±8,35)	1,39 (±1,07)	0,61 (±0,48)
Fosforo Total (mg/L)	1,35 (±0,65)	1,35 (±0,38)	3,92 (±3,37)	2,70 (±1,86)	1,94 (±0,91)	0,64 (±0,51)	0,66 (±0,87)
pH (un de pH)	6,91 (±0,27)	7,10 (±0,50)	7,18 (±0,14)	7,01 (±0,14)	6,62 (±0,79)	6,24 (±1,25)	6,64 (±1,20)
OD (mg/L)	4,01 ±1,16)	4,94 (±1,19)	3,92 (±1,57)	4,55 (±2,23)	4,29 (±2,19)	6,57 (±1,64)	5,72 (±2,00)
Cloreto (mg/L)	11,18 (±4,47)	17,05 (±6,31)	18,37 (±8,63)	27,08 (±15,43)	14,99 (±10,49)	20,39 (17,12)	13,69 (±3,42)
DQO (mg/L)	65,29 (±20,23)	89,71 (±64,59)	245,01 (±372,41)	93,49 (±81,34)	176,63 (±203,12)	195,79 (±260,4)	93,28 (±97,94)

FONTE: O AUTOR

Conforme apresentado anteriormente (item 3.1-Characterização da Área de Estudo), nos ambientes avaliados neste estudo, foi observada uma elevada densidade urbana e irregularidades frente ao sistema de saneamento básico, com impacto direto na qualidade de suas águas. A influência antrópica, é, provavelmente, a responsável pelos valores de nitrogênio amoniacal, que variaram de 0,05 a 33,1 mg/L, de fósforo total (0,08 a 9,30mg/L) e de outros parâmetros (Tabela 10), que indicaram um constante aporte de efluentes, principalmente de natureza doméstica, devido às características da ocupação desordenada da região.

Outra fonte de poluição a ser considerada é o escoamento superficial que, após as chuvas, pode transportar consideráveis quantidades de matéria orgânica proveniente do solo, plantas e esgoto anteriormente armazenado em galerias. Alguns indicativos desta contaminação podem ser os valores de DQO, que chegaram a 910,60 mg/L, no rio Atuba, ponto após a saída da ETE Atuba (AT-03). Outros resultados que corroboram com esta informação são os valores obtidos para as concentrações de nitrogênio orgânico, que atingiu ao valor de 160,83 mg/L nesta mesma região.

Com exceção do rio Itaquí (ponto IT-01) e Canal Paralelo (ponto CP-01), o restante dos pontos de coleta apresentaram valores de OD baixos, com mínimo de 1,25mg/L, refletindo os efeitos da atividade antropogênica na região. Para compreender estes níveis de poluição, deve-se considerar as características da área de influência dos pontos monitorados. Esta área inclui além de Curitiba, alguns municípios limítrofes tais como: Pinhais, Piraquara e São José dos Pinhais, conforme apresentado na Figura 30. De acordo com a SANEPAR (2006 *apud* PRZYBYSZ, 2007) a porcentagem de coleta de esgoto em Curitiba é de 80,2%, em Pinhais de 38,4%, em Piraquara de 45% e em São José dos Pinhais de 40,5%. A lei nº 11.445/07 estabelece diretrizes nacionais para o saneamento

básico e possui como fundamento, a universalização do acesso a esse serviço, ou seja, atendimento de 100% da população (BRASIL, 2007). Com exceção de Curitiba, nos demais locais da região metropolitana, o atendimento encontra-se inferior a 45%, sendo que nem todo esgoto coletado é tratado. Assim, os resultados dos parâmetros limnológicos apresentados neste estudo encontram-se de acordo com a realidade da região, em relação aos baixos valores de coleta de esgoto.

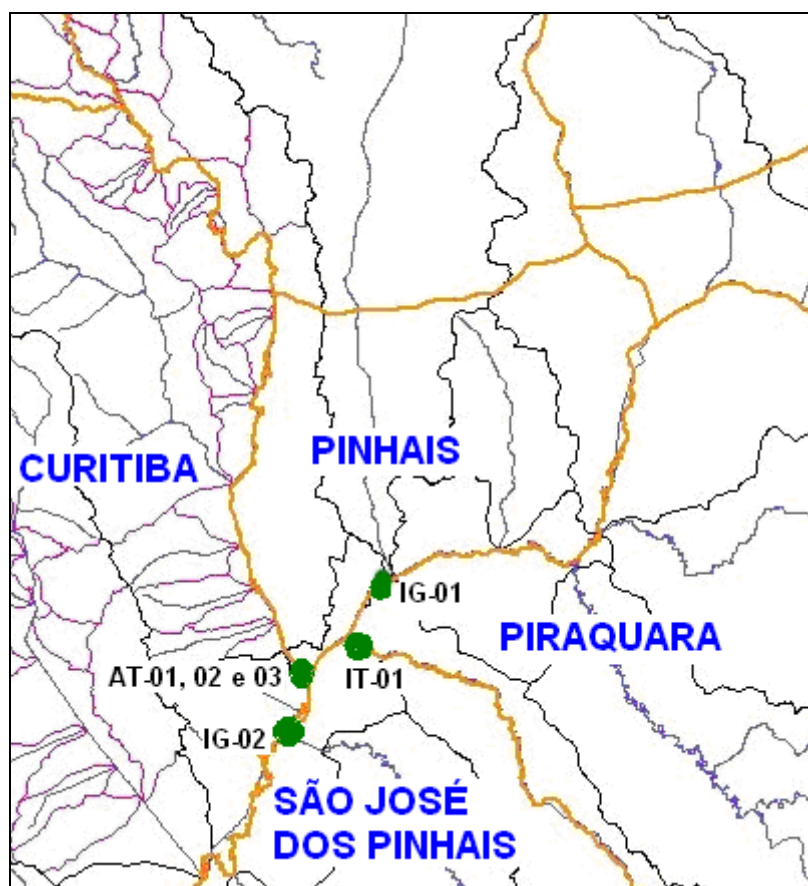


FIGURA 30 - LIMITES GEOGRÁFICOS DE MUNICÍPIOS LINDEIROS À ÁREA DE ESTUDO

FONTE: IPPUC (2010)

Em geral, os maiores valores dos parâmetros limnológicos apresentados na Tabela 10, foram predominantes nos pontos localizados no rio Atuba (AT-01, 02 e 03) e Iguaçu (IG-01 e 02), indicando os maiores níveis de poluição.

No rio Iguaçu, no ponto IG-01, parte da poluição deve-se, provavelmente, à proximidade com a foz do rio Palmital, sendo este considerado, pelo Instituto Ambiental do Paraná-IAP, como “Poluído” por meio da Avaliação do Índice de Qualidade da Água - AIQA. O ponto IG-02, também localizado no rio Iguaçu, possui como característica principal a

conexão com todos os pontos amostrados, localizado a jusante da área estudada recebe a influência de toda a bacia do Alto Iguaçu, incluindo além de Curitiba, os municípios de Pinhais, Piraquara e São Jose dos Pinhais, conforme apresentado na Figura 30.

No rio Atuba, os valores máximos de nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico e fósforo total (Tabela 10) para os pontos AT-02 e AT-03, localizados na saída e imediatamente a montante da ETE, refletem a influência da ETE Atuba Sul, tanto no rio Atuba como no rio Iguaçu (IG-02). De acordo com dados do IPPUC (2010), o ponto AT-02 é um canal de lançamento de efluente doméstico sem tratamento, proveniente de ocupações irregulares ao longo do rio Atuba. Canais semelhantes a esse são encontrados ao longo de todo o rio. No entanto, o ponto AT-02, mais especificamente, refere-se ao esgoto doméstico proveniente do bairro Cajuru, sem tratamento.

Em relação ao rio Itaquí e Canal Paralelo, pontos IT-01 e CP-01, respectivamente, os maiores valores de concentração de nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico, fósforo total, cloreto e DQO, foram obtidos no rio Itaquí, em relação ao Canal Paralelo (Tabela 10). Neste caso, estes resultados indicam que o Canal Paralelo, também conhecido como Canal Extravisor, sofre contaminação proveniente do rio Itaquí, visto que o ponto de coleta é localizado após a sua foz, no Canal Paralelo.

Além dos parâmetros limnológicos acima apresentados, também foi avaliada a variação do COD, nos pontos monitorados, conforme apresentado na Figura 31. Observou-se que na coleta realizada em ago/09 foram obtidos valores mais elevados de COD nos pontos IG-02 (62,16mg/L) e AT-01 (45,82 mg/L). Já no ponto AT-02, localizado nas proximidades da ETE Atuba Sul, a maior concentração de COD neste local (31,54 mg/L) ocorreu na coleta de abril/09 (Figura 31). Esta variação observada na concentração do COD foi avaliada por espectroscopia na região do ultravioleta e emissão de fluorescência, para identificar as prováveis fontes e características da matéria orgânica dissolvida nos pontos amostrados.

Segundo Westerhoft e Anning (2000), valores de $SUVA_{254}$ próximos de 1,2 L/mg.m são característicos da presença de esgoto doméstico e grande atividade biológica, enquanto valores acima de 4,4 L/mg.m indicam fonte alóctone com elevadas concentrações de ácidos fúlvicos. Rostan e Cellot (1995) consideram a razão entre a absorvância no comprimento de onda de 285 nm e o COD na caracterização da composição do COD, onde valores de A_{285}/COD inferiores a 10 L/g indicam a presença de matéria orgânica lábil, e valores próximos de 20 L/g indicam matéria orgânica alóctone com elevadas concentrações de ácidos fúlvicos.

Os valores médios de $SUVA_{254}$ e A_{285}/COD da Tabela 11 indicam uma provável mistura de fonte autóctone, resultante da atividade biológica no ambiente e alóctone, principalmente a entrada de efluente doméstico na composição da matéria orgânica

dissolvida. Quando os valores de $SUVA_{254}$ são baixos, pode ser um indicativo de que a matéria orgânica dissolvida seja proveniente da atividade antrópica, como esgoto doméstico, que apresenta dissolução de carbono orgânico e baixa absorção na região do UV, diminuindo assim tanto a razão $SUVA_{254}$, quanto A_{285}/COD (KNAPIK, 2009). Além disso, trata-se de um ambiente lótico, em que a produtividade primária é pequena, reforçando o predomínio de COD decorrente da entrada de efluentes domésticos.

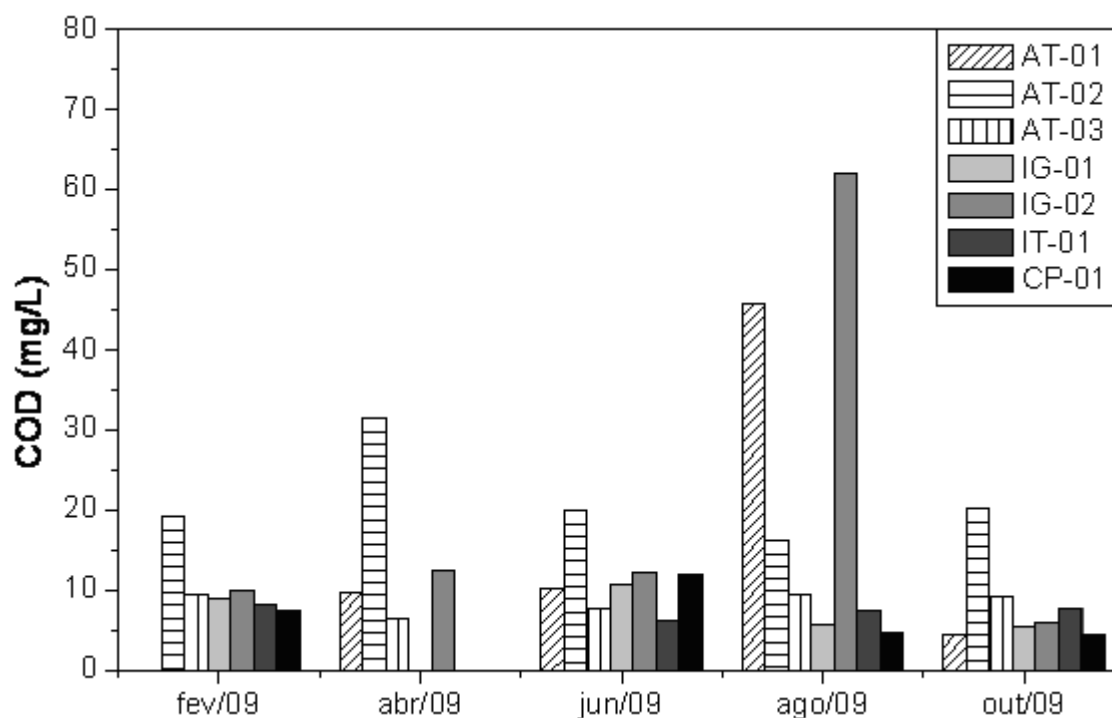


FIGURA 31 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE COD (mg/L) NOS PONTOS MONITORADOS

FONTE: O AUTOR

A predominância de carbono orgânico dissolvido nos pontos amostrados, proveniente de esgoto doméstico, além dos parâmetros limnológicos (Tabela 10), também foi comprovada pela razão entre as intensidades de fluorescência emitida nos comprimentos de onda 450 e 500nm ($FR = \lambda_{450}/\lambda_{500}$), com excitação de 370 nm. Esta razão pode ser usada para caracterizar a fonte (WESTERHOFF E ANNING 2000) ou verificar o grau de humificação da matéria orgânica dissolvida (MCKNIGHT *et al.* 2001, WU *et al.* 2007). Valores de $FR > 1,8$ indicam carbono orgânico dissolvido de fonte autóctone ou de esgoto doméstico e $FR \leq 1,5$ indicam fonte alóctone pedogênica, principalmente substâncias húmicas. Neste estudo, os valores de FR indicam que o COD apresenta estruturas menos complexas, pois foram obtidos valores para FR maiores do que 1,8 (Tabela 11), confirmando a influência do esgoto doméstico no COD.

Ao serem considerados os valores de A_{285}/COD , observou-se que no ponto IG-01 existe uma possibilidade de influência pedogênica na composição do COD, contrariando assim os valores de SUVA_{254} e FR, e indicando que neste ambiente, além do esgoto doméstico, existe a possibilidade da presença de efluentes de outra natureza, cuja composição apresenta compostos fenólicos dissolvidos que apresentam maior absorvância em 285nm e maiores valores de FR, por ser uma estrutura menos complexa do que substâncias húmicas.

Ainda em relação a contaminação por esgoto doméstico, outro indício desta contaminação é a intensidade de fluorescência emitida com excitação de 370nm. Westerhoff e Anning (2000) consideram como fonte alóctone quando o máximo da intensidade de fluorescência emitida (PW) ocorrer em comprimento de onda maior do que 450nm e de fonte autóctone se menor do que 450nm. Por outro lado, Ahmad e Reynolds (1995), Chen *et al.* (2002) e Pons, Bonté e Potier (2004) utilizaram em seus estudos a determinação da fluorescência para diferenciar a matéria orgânica de origem natural da matéria orgânica dissolvida, proveniente de esgoto doméstico, sendo que o deslocamento do pico, de máxima intensidade, para menor comprimento de onda, indicou que a substância dissolvida, apresentava estrutura molecular mais simples e com menor massa molecular, ou seja, substâncias dissolvidas em esgoto doméstico, que são menos complexas. Entretanto, as substâncias húmicas, que apresentam estruturas complexas, estruturas aromáticas, e maior massa molecular, apresentam seu pico máximo de emissão em comprimentos de onda mais longos, ou seja, de menor energia.

Neste estudo, os maiores valores de PW, de 448nm (Tabela 11), foram obtidos em locais com menor influência ou carga de esgotos domésticos, que foram o Canal Extravador e o rio Itaqui. Como pode ser observado, tanto na Tabela 11 como na Figura 32, na maioria dos pontos coletados, a intensidade máxima de fluorescência emitida foi em comprimentos de onda menor do que 450 nm, sendo um indicativo da predominância do COD decorrente da entrada de esgoto doméstico. Nos casos das amostragens no rio Itaqui e no Canal extravador, observou-se que ocorre uma mistura de matéria orgânica dissolvida de fonte alóctone proveniente de esgoto doméstico e de fonte pedogênica (Tabela 11).

Assim, os elevados valores, observados na Figura 31 nos pontos IG-02, AT-01 e AT-02, representam, provavelmente, a entrada de maiores cargas de esgoto doméstico no local, pois este aumento na quantidade de COD não alterou os valores de FR, SUVA_{254} e A_{285}/COD , indicando assim que não foi proveniente de fonte pedogênica.

TABELA11 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS RELAÇÕES DA ABSORVÂNCIA, INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA E CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO (COD) NOS PONTOS MONITORADOS

Ponto	COD	SUVA ₂₅₄	A ₂₈₅ /COD	FR	PW
IG-01	8,47 (±2,68)	2,53 (±0,92)	21,10 (±8,03)	2,20 (±0,41)	443 (±7)
IG-02	10,23 (±3,08)	1,47 (±0,12)	12,86 (±3,86)	2,07 (±0,17)	446 (±6)
AT-01	8,28 (±3,23)	1,42 (±0,43)	11,41 (±2,96)	2,10 (±0,48)	441 (±9)
AT-02	22,79 (±5,85)	1,63 (±1,54)	11,38 (±5,16)	2,26 (±0,20)	442 (±6)
AT-03	8,32 (±1,40)	0,91 (±0,55)	8,88 (±5,54)	2,42 (±0,46)	441 (±2)
IT-01	7,48 (±1,02)	2,22 (±0,76)	17,17 (±6,04)	1,95 (±0,25)	448 (±5)
CP-01	8,12 (±3,84)	2,05 (±0,28)	16,24 (±2,11)	2,16 (±0,55)	448 (±4)

FONTE: O AUTOR

NOTA: COD: concentração de carbono orgânico dissolvido (mg/L); SUVA₂₅₄: absortividade em L/mg.m; A₂₈₅/COD: absortividade em L/g; FR: razão entre as intensidades de fluorescência emitidas nos comprimentos de onda de 450 e 500 nm, com excitação de 370 nm; PW: comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência emitida, com excitação em 370 nm.

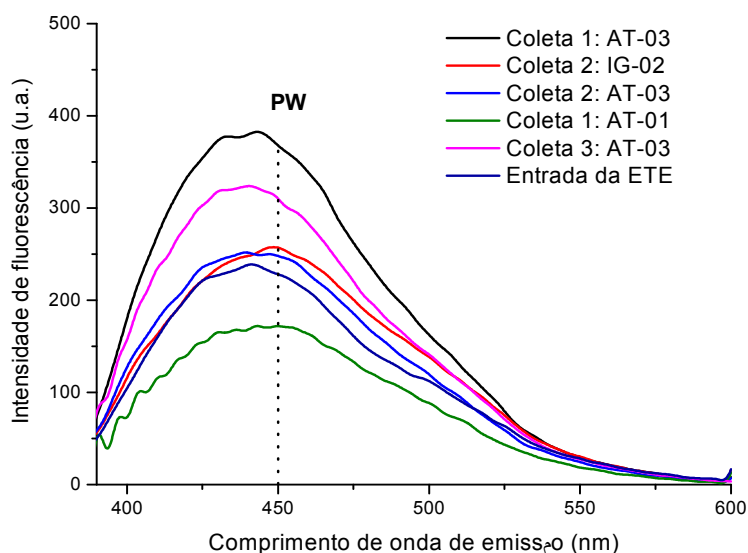


FIGURA 32 - VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA, NAS AMOSTRAS DO PONTO A JUSANTE DA ETE ATUBA SUL (AT-03), EMITIDA COM EXCITAÇÃO DE 370 nm, EM UNIDADES ARBITRÁRIAS (u.a.)

FONTE: O AUTOR

O predomínio do esgoto doméstico como fonte da matéria orgânica dissolvida também foi confirmado pelos espectros sincronizados apresentados na Figura 33, onde os espectros de todos os pontos monitorados apresentaram uma banda entre 280 e 300 nm.

De acordo com a literatura, em espectros sincronizados, a banda entre 280 a 300 nm caracteriza substâncias com cadeia carbônica mais simples (ex. um anel aromático) provenientes da produtividade primária (FERRARI E MINGAZZINI, 1995; PEURAVUORI E PIHLAJA, 1997; PEURAVUORI, KOIVIKKO E PIHLAJA, 2002); ou provenientes de compostos existentes em esgoto doméstico (AHMAD E REYNOLDS, 1995; MA, ALLEN E YIN, 2001). Por outro lado, quando ocorre predomínio de substâncias húmicas, principalmente de ácidos fúlvicos, a banda acima de 450 nm tende a ser mais intensa, pois é nesta região que o ácido fúlvico e húmico emitem fluorescência (FERRARI E MINGAZZINI, 1995; SENESI *et al.*, 1989, SENESI, 1990; PEURAVUORI E PIHLAJA, 1997; PEURAVUORI, KOIVIKKO E PIHLAJA, 2002).

Considerando que a banda próxima de 280nm de emissão é característica em esgoto doméstico, a Figura 33 indica predomínio da entrada de esgoto doméstico em todos os pontos monitorados no rio Atuba e no Iguaçu. Por outro lado no Canal Extravisor (CP-01) e no rio Itaquí (IT-01) esta banda apresentou menor intensidade, indicando que nestes ambientes a influência do esgoto era menor, principalmente, se for comparado com o espectro do afluente da ETE Atuba Sul. Como o mesmo pico, na Figura 33, foi observado no Rio Atuba, tanto a montante (AT-01) como a jusante da ETE (AT-03), isto indica que ocorre a entrada de esgoto sem tratamento no rio Atuba, fato comprovado pelas informações fornecidas pelo IPPUC (2010) sobre a existência de canais de lançamento de esgoto doméstico sem tratamento, ao longo do rio Atuba, sendo um deles o ponto AT-02.

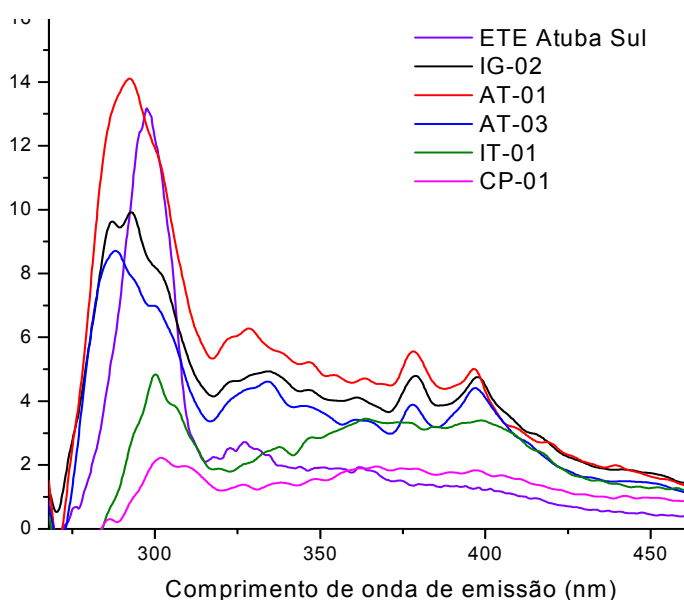


FIGURA 33 - ESPECTROS SINCRONIZADOS ($\Delta\lambda=18$ nm) DO RIO ATUBA (AT-01 E AT-03), RIO IGUAÇU (IG-02), RIO ITAQUI (IT-01), CANAL EXTRAVASOR (CP-01) E DA ENTRADA DA ESTAÇÃO DE ESGOTOS DA ETE-ATUBA SUL (ETE), DA COLETA 3 (JUN/09)

FONTE: O AUTOR

Por meio das informações obtidas na Figura 33, onde os espectros apresentaram banda característica de esgoto doméstico em todos os pontos monitorados nos rios Atuba e Iguaçu; elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal (4,48 a 24,82mg/L) e fósforo total (1,35 a 3,92mg/L), entre outros parâmetros limnológicos apresentados na Tabela 10, para estes pontos; baixos valores de $SUVA_{254}$ ($<4,4$) e A_{285}/COD (próximos a 10), e comprimentos de onda de máxima intensidade de fluorescência menores que 450 nm, conforme apresentado na Tabela 11 e Figura 32, percebe-se que o efluente da ETE Atuba Sul, mesmo após tratamento continua liberando nutrientes ao rio Atuba e Iguaçu, e contribuindo com a concentração de COD.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, não ocorre contribuição significativa de substâncias húmicas de fonte alóctone pedogênica como principal fonte de carbono orgânico dissolvido, pois além dos valores de $SUVA_{254}$ ($<4,4$), A_{285}/COD (próximos a 10) e FR ($>1,8$) observados na Tabela 11, as intensidades emitidas acima de 450nm, que indicam esta influência, são baixas, quando comparadas às intensidades emitidas em comprimentos de onda abaixo de 450nm, que indicam influência por esgoto doméstico e são maiores.

4.3.2 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NO MEIO AMBIENTE (ÁGUA E SEDIMENTO)

Água Superficial

Ainda que o tema deste estudo seja voltado para a presença de HSFs no meio ambiente, concomitante à pesquisa destes compostos, encontra-se a análise dos indícios e características da poluição antrópica na área estudada, comumente relacionada ao uso e ocupação do solo. Portanto, os resultados obtidos na avaliação da qualidade da água, na região estudada que indicaram poluição antrópica, principalmente por lançamento de esgoto doméstico, tornam-se uma evidência da presença de HSFs na área estudada, pois sua principal fonte é a urina.

Entre os hormônios pesquisados, o 17β -Estradiol (E2) foi o que se apresentou em maior concentração e frequência nas amostragens, variando de $<0,10$ a $13,45 \mu\text{g/L}$ (Tabela 12). Trata-se de um dos principais estrogênios produzidos pelo corpo humano, exercendo papel fundamental no controle do ciclo menstrual. Além disso, é um estrogênio comumente utilizado na formulação de anticoncepcionais, sendo, portanto, de origem natural e sintética. Portanto, sua detecção em águas superficiais é um forte indício de contaminação por aporte de esgoto doméstico, o que é condizente com as características da área de estudo, considerando as baixas porcentagens de coleta de esgoto, principalmente na região

metropolitana de Curitiba. Segundo Raimundo (2007), aproximadamente, meia tonelada de E2 é incorporado, diariamente, ao esgoto em todo o Brasil. Isso justifica a maior concentração desse composto em águas superficiais impactadas antropicamente em relação aos outros compostos pesquisados.

Em relação ao 17 α -Ethinilestradiol (EET), segundo hormônio encontrado em maior quantidade e frequência, as concentrações variaram de <0,12 a 5,90 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 12), isso se deve ao fato deste composto ser um estrogênio sintético utilizado, principalmente, em anticoncepcionais, tendo uma absorção, pelo organismo humano, de aproximadamente 15% apenas, sendo o restante eliminado pela urina (JOHNSON E WILLIAMS, 2004). Além do ser humano, rebanhos bovinos e suínos também excretam HSFs naturais. Apesar do uso e ocupação do solo da área estudada não apresentar grandes atividades de agropecuária, ainda que houvesse a existência destes animais na área de estudo, a presença do EET confirma a contaminação por esgoto humano, visto que é um hormônio sintético.

A Estrona (E1), por sua vez, apresentou as menores concentrações entre os estrogênios, variando de <0,10 a 1,80 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 12). Este hormônio tem sua origem apenas no corpo humano, ou seja, fonte exclusivamente natural, sendo doze vezes menos ativo que o E2.

A progesterona (PG) foi o composto encontrado em menores concentrações, variando de <0,06 a 0,45 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 12). Trata-se de um hormônio relacionado à gravidez e, apesar de ser liberado durante todo o ciclo ovariano feminino, é somente durante a gravidez que maiores concentrações deste hormônio são liberadas (GOLDEFIEN, 1995).

Em geral, as concentrações de HSFs, em água superficial, encontradas neste estudo conforme Tabela 12, apresentaram valores acima daqueles observados em outros estudos, realizados no Brasil e em outros países, conforme apresentado na Tabela 13 que contém os resultados de HSFs obtidos por diversos autores. Entre os estudos analisados, os valores mais elevados de HSFs foram obtidos por Raimundo (2007) em Campinas, São Paulo que chegaram a 6.806 ng/L de E2 (Tabela 13). No entanto, neste estudo foram observadas concentrações ainda mais elevadas, que chegaram a 13.450 ng/L também de E2 (Tabela 12). Esta diferença pode estar associada ao nível de contaminação da área estudada, conforme mencionado anteriormente. Estudos de monitoramento realizados na região, pelo Instituto Ambiental do Paraná-IAP, no período de 1992 a 2006, acusaram um elevado grau de poluição, com destaque para o aporte excessivo de esgoto doméstico (AZEVEDO *et al.*, 2007). Przybysz (2007) reforça este cenário afirmando que “na bacia do Alto Iguaçu, um dos maiores problemas de poluição é o lançamento de esgoto com pouco ou nenhum tratamento, envolvendo irregularidades e uso incorreto da rede coletora de esgoto”. Ainda, comparando os resultados obtidos neste estudo com a literatura, deve-se considerar também a época da realização dos estudos da literatura. Segundo Fernandes

(2007), o consumo de anticoncepcionais no Brasil cresce 23 % ao ano, o que leva a supor que, se novos estudos fossem realizados, provavelmente, as concentrações poderiam ser maiores nestes ambientes, caso o sistema de saneamento não tivesse sido melhorado.

TABELA 12 - CONCENTRAÇÕES DE HSFs ($\mu\text{g/L}$) NAS AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL DO RIO IGUAÇU (IG), ATUBA (AT), ITAQUI (IT) E CANAL EXTRAVASOR (CP)

Hormônio	Coleta	IG-01	AT-01	AT-02	AT-03	IG-02	IT-01	CP -01
E2	fev/09	2,09	--	0,33	13,45	5,92	1,78	1,10
	abr/09	--	4,55	4,33	8,93	5,39	--	--
	jun/09	5,85	5,51	11,13	4,41	6,28	1,97	2,15
	ago/09	4,42	4,03	5,83	9,77	3,67	0,17	3,21
	out/09	ND	1,96	ND	2,66	ND	ND	ND
EET	fev/09	ND	--	0,70	5,90	4,53	0,17	0,67
	abr/09	--	1,26	ND	ND	ND	--	--
	jun/09	2,82	ND	0,98	4,53	0,85	ND	ND
	ago/09	2,36	2,28	3,52	2,94	0,63	ND	3,98
	out/09	ND	0,16	ND	0,60	ND	0,16	ND
E1	fev/09	ND	--	0,83	1,80	ND	0,14	0,65
	abr/09	--	0,34	ND	ND	ND	--	--
	jun/09	ND	ND	ND	ND	0,29	ND	ND
	ago/09	ND	ND	0,92	0,25	0,76	ND	1,04
	out/09	ND	0,12	0,20	0,45	ND	ND	ND
PG	fev/09	--	--	--	--	--	--	--
	abr/09	--	ND	ND	ND	ND	--	--
	jun/09	ND	0,15	0,22	0,12	0,35	ND	ND
	ago/09	0,14	0,28	ND	0,45	0,14	0,28	0,31
	out/09	ND	0,35	ND	0,15	ND	ND	0,07

FONTE: O AUTOR

NOTA: ND: não detectável ($LQ_{E1 \text{ e } E2}$: 0,10 $\mu\text{g/L}$; LQ_{EET} : 0,12 $\mu\text{g/L}$ e LQ_{PG} : 0,06 $\mu\text{g/L}$)

Além de estarem acima dos resultados obtidos por outros autores, as concentrações de HSFs observadas, em todos os pontos deste estudo (Tabela 12), quando detectadas, também estão acima da concentração mínima capaz de causar efeito tóxico à biota aquática, que é de 10 ng/L para o E1 e E2 e de 1,0 ng/L para o EET (HEISTERKAMP, GANDRASS E RUCK, 2004; BECK *et al.*, 2005; BAREL-COHEN *et al.*, 2006).

TABELA 13 - CONCENTRAÇÕES DE HSFs (ng/L) EM ÁGUA SUPERFICIAL OBTIDAS POR DIVERSOS AUTORES

Origem / HSFs (ng/L)	E1	E2	EET	PG	Fonte
Holanda	0,3 a 3,4	0,6 a 5,5	0,3 a 4,3	--	Belfroid <i>et al.</i> , (1999)
Alemanha	4,1	3,6	5,1	--	Kuch e Ballschmiter (2001)
EUA	--	--	--	110	Wolpin <i>et al.</i> , (2002)
EUA	<0,3	<0,1	--	--	Boyd <i>et al.</i> , (2003)
Espanha	22	<2,5	<2,5	--	Mozaz, Alda e Barceló (2004)
Israel	--	--	6,1	--	Barel Cohen <i>et al.</i> , (2006)
Japão	51	--	--	--	Yamamoto <i>et al.</i> , (2006)
Brasil-Campinas	1,2 a 1,7	1,9 a 3,0	--	--	Ghiselli (2006)
Brasil-Campinas	<16	106 a 6.806	501 a 4.390	87 a 195	Raimundo (2007)
Brasil-Curitiba	120 a 1.040	170 a 13.450	160 a 5.900	70 a 450	Neste trabalho

NOTA: As fontes utilizadas encontram-se descritas na própria tabela

Variação Espacial

Em relação à distribuição espacial dos HSFs, os pontos IG-02 e AT-03 apresentaram as maiores cargas de estrogênios que foram, respectivamente, de 6,64 e 5,14kg/d de E2; 3,37 e 2,18kg/d de EET e 0,70 e 0,66kg/d de E1, enquanto para a Progesterona (PG) as maiores cargas foram encontradas nos pontos AT-01 e IG-02 e foram de 0,39 e 0,25kg/d, respectivamente (Tabela 14 e Figura 34). As menores cargas de todos os hormônios pesquisados foram encontradas no ponto IT-01, seguido do CP-01 e IG-01 os quais apresentaram, em grande parte das coletas, concentrações de hormônios não detectáveis (Tabela 14). As cargas foram calculadas a partir dos valores de concentração e vazão.

A distribuição espacial descrita acima está de acordo com o cenário de poluição por esgoto doméstico da área de estudo. Conforme comentado, anteriormente, tanto a ETE Atuba Sul como lançamentos de esgoto sem tratamento, realizados ao longo do rio Atuba conferem aos pontos IG-02 e AT-03, maior contaminação por esgoto doméstico e, conseqüentemente, maiores cargas de estrogênios. Para a Progesterona (PG), as maiores cargas provenientes dos pontos AT-01 e IG-02 podem estar relacionadas à contribuição de poluição do rio Palmital no ponto IG-01 causando um aumento da carga deste hormônio no ponto IG-02 a jusante, e à diminuição da carga deste hormônio após tratamento na ETE, o que confere ao ponto AT-01, a montante da ETE, maiores cargas de PG. O comportamento dos HSFs, durante o tratamento nas ETEs, será discutido na sequência deste capítulo.

TABELA 14 - CARGAS DE HSFs (kg/dia) OBSERVADAS NOS PONTOS MONITORADOS DURANTE O PERÍODO DE ESTUDO (FEV/09 - OUT/09)

Parâmetro	Coleta	AT-01	AT-02	AT-03	IG-01	IG-02	IT-01	CP-01
E2	fev/09	/	0,12	4,96	0,41	4,40	0,08	0,23
	abr/09	2,39	2,46	5,14	/	6,64	/	/
	jun/09	1,96	4,28	1,72	0,83	4,44	0,06	0,32
	ago/09	1,62	2,54	4,35	0,99	3,40	0,01	1,13
	out/09	2,17	ND	3,21	ND	ND	ND	ND
EET	fev/09	/	0,25	2,18	ND	3,37	0,01	0,14
	abr/09	0,66	ND	ND	/	ND	/	/
	jun/09	ND	0,38	1,77	0,40	0,60	ND	ND
	ago/09	0,92	1,53	1,31	0,53	0,58	ND	1,40
	out/09	0,18	ND	0,72	ND	ND	0,01	ND
E1	fev/09	/	0,30	0,66	ND	ND	0,01	0,13
	abr/09	0,18	ND	ND	/	ND	/	/
	jun/09	ND	ND	ND	ND	0,20	ND	ND
	ago/09	ND	0,40	0,11	ND	0,70	ND	0,37
	out/09	0,13	0,24	0,54	ND	ND	ND	ND
PG	fev/09	/	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	abr/09	ND	ND	ND	/	ND	/	/
	jun/09	0,05	0,08	0,05	ND	0,25	ND	ND
	ago/09	0,11	ND	0,16	0,03	0,13	0,02	0,11
	out/09	0,39	ND	0,12	ND	ND	ND	0,03

FONTE: O AUTOR

Em contradição ao estudo da qualidade da água realizado nos pontos IT-01 e CP-01, o ponto que apresentou as menores cargas dos HSFs pesquisados foi o ponto do rio Itaqui, ponto IT-01 (Tabela 14). De acordo com os parâmetros limnológicos, com enfoque nas concentrações de fósforo e N-amoniaco, (Tabela 10), o rio Itaqui apresentou maiores concentrações de nutrientes que o Canal Extravaso. Por outro lado, em termos de carga de HSFs, o Canal Extravaso apresentou os maiores valores, indicando que a concentração de HSFs, provavelmente, pode estar relacionada a outros fatores além da entrada de esgoto doméstico, como composição química da água e sedimento e características da área em torno do local de coleta.

Outra hipótese que pode ser considerada está relacionada à lagoa do Itaqui, por onde passa toda a carga poluente do rio Itaqui proveniente de montante, principalmente da ETE Itaqui. Nesta lagoa pode ser observada uma grande quantidade de macrófitas submersas e maiores valores de OD. Considerando que o ponto IT-01 está localizado a jusante desta lagoa, supõe-se que a lagoa do Itaqui esteja retraindo HSFs ao sedimento ou favorecendo a autodepuração da carga poluente do rio Itaqui, justificando assim, os menores valores de HSFs no ponto IT-01 em relação ao Canal Extravaso. Neste caso, a

lagoa passa a influenciar a quantidade de OD no rio Itaqui, que foi ligeiramente superior ao do Canal Extravador (Tabela 10), esta característica do meio pode ser responsável pelas menores concentrações de HSFs no rio Itaqui comparado ao Canal Extravador, por promover uma biodegradação mais aeróbia. De acordo com a literatura, o meio aeróbio apresenta maior potencial de biodegradação de HSFs quando comparado a meios anaeróbios ou anóxicos. (LEE E LIU, 2002, SERVOS *et al.*, 2005, JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000).

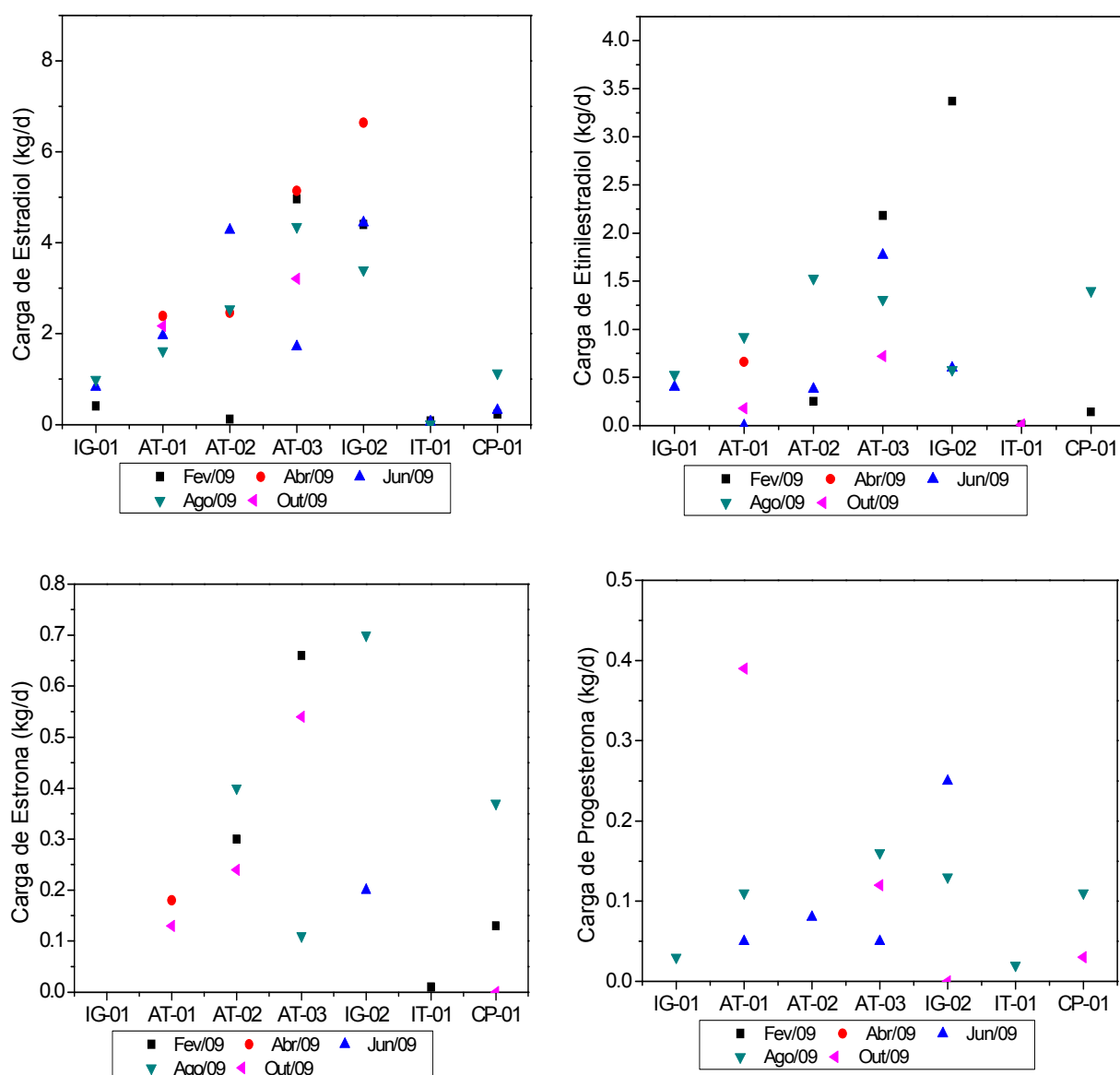


FIGURA 34 - VARIAÇÃO DAS CARGAS DE HSFs NOS PONTOS MONITORADOS, DURANTE O PERÍODO DE FEV/09 A OUT/09

FONTE: O AUTOR

NOTA: Valores apresentados como zero representam concentrações não detectáveis. Os pontos IG-01, IT-01 e CP-01 não foram monitorados na segunda coleta (Abr/09), não apresentando, portanto, cargas neste período.

A partição sedimento/água é outra hipótese que pode estar relacionada à redução das cargas de HSFs no rio Itaqui, representada pelo coeficiente de partição K_d . Este pode sofrer interferências de alguns fatores, como: tamanho da partícula, pH, teor de carbono orgânico e concentração de sólidos suspensos, entre outras características do local (JOHNSON E WILLIAMS, 2004; CARBALLA, OMIL, E LEMA, 2007). A interferência destes fatores sobre os valores de K_d pode resultar em menor fração de hormônios na água em relação ao sedimento no rio Itaqui. No entanto, esta hipótese não pode ser confirmada, pois não foi avaliada a concentração de HSFs no sedimento do ponto IT-01. Maiores detalhes sobre o coeficiente de partição dos HSFs serão apresentados na sequência.

Variação Temporal

Com a finalidade de considerar as particularidades de cada local de amostragem na análise dos resultados, a distribuição temporal dos HSFs, entre outras evidências relacionadas a sua presença no meio ambiente, foram analisadas considerando cada rio individualmente.

Nos pontos monitorados no rio Iguaçu houve um aumento na carga de E2 entre a coleta de fev/09 e abr/09, quando apresentou máximo de 6,64 kg/dia em abr/09 (Tabela 14). Após este período, ocorreu um decréscimo na carga de E2 até não detectável na última coleta realizada em out/09. Em contrapartida, o E1 só foi detectado nas coletas seguintes ao máximo de E2, ou seja, em jun/09 e ago/09 com cargas de 0,20 e 0,70 kg/dia, respectivamente (Tabela 14). Dependendo das condições de oxigenação do meio pode ocorrer a oxidação do E2 a E1, o que justificaria a redução do E2 e aumento de E1 no rio Iguaçu.

A Figura 35 apresenta a variação da concentração de E2 em relação à vazão e ao aumento da concentração de OD no rio Iguaçu. Estes resultados corroboram a hipótese que o aumento da concentração de OD reduz a concentração de E2 ($R = -0,7688$ $p = 0,0154$). Também é possível observar o aumento da concentração de E1 com o aumento da vazão ($R = 0,6788$ $p = 0,0461$), indicando que o aumento da vazão, proveniente da precipitação, oxigena a água do rio pela turbulência ou diluição de poluentes, causando a redução da concentração do E2 (oxidação) e aumento da concentração do E1. Outra hipótese é que o aumento da vazão pode estar alterando a eficiência do tratamento anaeróbio na ETE Atuba Sul na redução de HSFs.

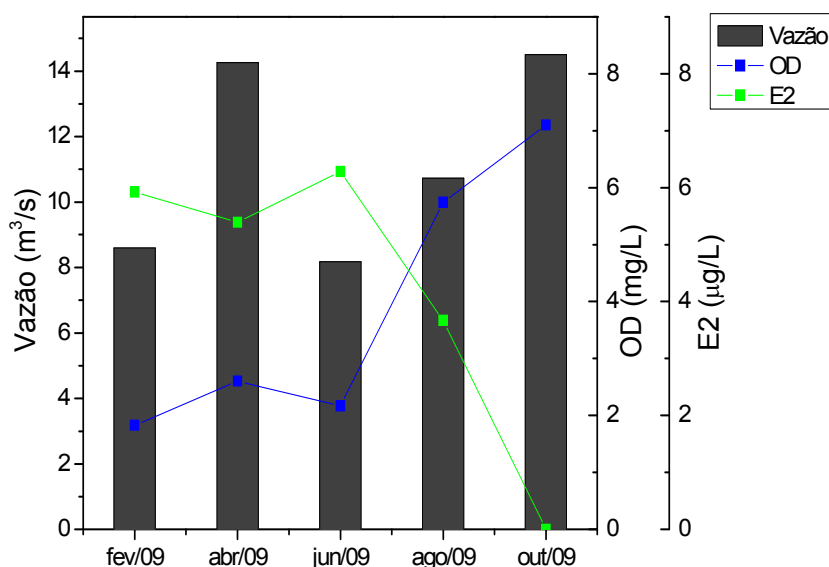


FIGURA 35 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE E2 ($\mu\text{g/L}$) E OD (mg/L) E SUA RELAÇÃO COM A VAZÃO (m^3/s) DO RIO IGUAÇU NO PERÍODO ESTUDADO (FEV/09 – OUT/09)

FONTE: O AUTOR

Ainda em relação ao rio Iguaçu, algumas relações observadas entre os HSFs e os parâmetros limnológicos indicaram o aporte de esgoto doméstico como fonte predominante destes compostos. Foi observado um aumento na concentração de nitrogênio orgânico total ($R = 0,7794$, $p = 0,0132$), fósforo dissolvido ($R = 0,7056$, $p = 0,0336$) e COD ($R = 0,9442$, $p = 0,0001$) com o aumento da concentração dos estrogênios pesquisados.

Além disso, no rio Iguaçu, uma relação semelhante à relação entre o E2 e OD (Figura 35), foi observada para o N-amoniaco e nitrato, principalmente nas duas últimas campanhas, conforme apresentado na Figura 36. O aumento da concentração de nitrato de 0,05 para 1,41 mg/L e a consequente redução da concentração de amônia de 17,85 para 1,18 mg/L , com o aumento da vazão do rio até 14,50 m^3/s (out/09), (Figura 36), indicaram que além do efeito de diluição, provocado pela chuva na região, também ocorreram alterações nos processos de nitrificação com o aumento da concentração de OD na água do rio, corroborando com os resultados da oxidação dos HSFs, o que significa diminuição da concentração de E2 e aumento da concentração de E1.

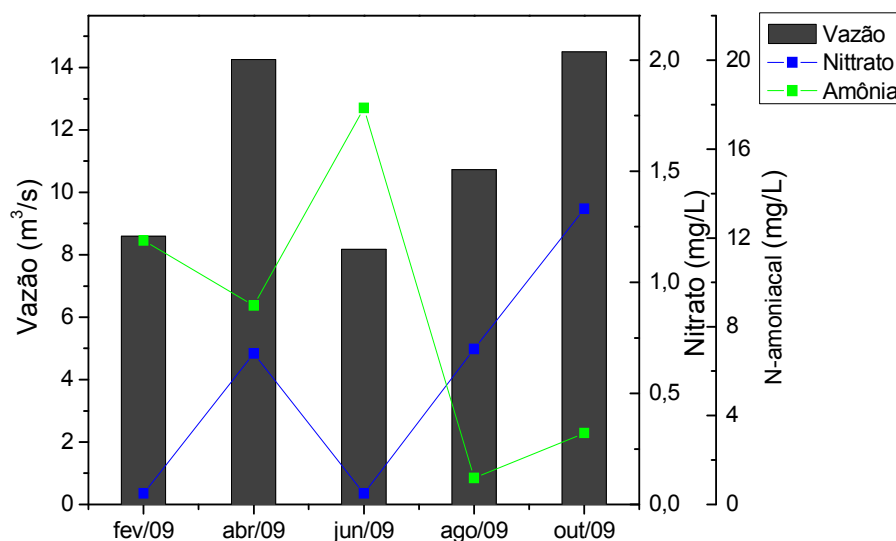


FIGURA 36 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE N - AMONIAICAL E NITRATO (mg/L) E SUA RELAÇÃO COM A VAZÃO DO RIO IGUAÇU NO PERÍODO ESTUDADO (FEV/09 – OUT/09)

FONTE: O AUTOR

No rio Atuba foram observados alguns aspectos semelhantes àqueles do rio Iguaçu, no que diz respeito à nitrificação. Entretanto, foi possível observar a influência de baixos níveis de OD na região monitorada (mínimo de 1,25 mg/L e média de 4,43 mg/L \pm 1,67) e da proximidade com a ETE, devido a presença de nitrito em maiores concentrações (1,00 a 541,00 μ g/L), que é uma forma intermediária da oxidação do nitrogênio amoniacal, comum em ambientes mais redutores. Este fato pode ser confirmado pela correlação entre a DQO e o nitrito ($R = 0,9067$, $p = 7,74 \cdot 10^{-6}$), o que indica que o aporte de matéria orgânica que causou o aumento da concentração da DQO, diminuiu o OD, alterando a nitrificação do meio e promovendo o aumento da concentração de nitrito. A correlação entre a vazão e a concentração de nitrito ($R = 0,7530$, $p = 0,0018$) também é um outro fator a ser considerado neste ponto, pois o aumento da vazão aumentou o volume de esgoto doméstico carregado para o rio Atuba, ou pelo aumento do volume de esgoto que chega na ETE Atuba Sul e é descartado mais rapidamente no rio Atuba ou o proveniente do Bairro Cajuru por meio do ponto AT-02.

Em relação às cargas de HSFs no rio Atuba, foi observado influência da localização de cada ponto. O ponto AT-01, a montante da ETE, apresentou baixas cargas de estrogênios (máximo de 2,39kg/d de E2; 0,92kg/d de EET e 0,39kg/d de E1), comparado aos outros pontos AT-02 e AT-03 (máximo de 4,28 e 5,14kg/d de E2, 1,53 e 2,18kg/d de EET e 0,40 e 0,66kg/d de E1, respectivamente). No entanto, apresentou elevadas cargas de

PG, máximo de 0,39 kg/dia, comparado aos outros pontos no rio Atuba, que variaram de 0,05 a 0,16kg/d (Tabela 14). De acordo com a análise dos espectros sincronizados de emissão de fluorescência (Figura 33), discutidos anteriormente, o rio Atuba sofre contaminação por esgoto doméstico lançado clandestinamente a montante da ETE Atuba Sul e ao longo do rio, que pode ser responsável pelos valores tanto das cargas de PG como de estrogênios, no ponto AT-01.

Considerando que foi observada uma relação entre as concentrações de PG e de nitrato ($R = 0,6771$, $p = 0,0078$) a presença de maiores concentrações de nitrato é acompanhada pela presença de maiores concentrações de PG na água. No ponto AT-01, foram observadas concentrações de nitrato mais elevadas (0,37 a 2,07 mg/L), comparado aos demais pontos deste rio: AT-02 e AT-03 (0,01 a 0,82 mg/L), indicando que, no ponto AT-01, o processo de nitrificação é menos afetado, pois a concentração de OD foi suficiente para a oxidação do N-amoniaco a nitrato, caracterizando um ambiente mais oxidante. Nos pontos AT-02 e AT-03, próximos à ETE, ocorreu diminuição dos valores de OD, mínimo de 1,25 mg/L, e aumento das concentrações de nitrito, indicando um ambiente mais redutor, o que caracteriza uma contaminação mais recente, provavelmente ligada à proximidade com a ETE Atuba Sul.

Assim, retomando a relação observada entre as concentrações de PG e de nitrato, ($R = 0,6771$, $p = 0,0078$), supõe-se que a característica oxidante/redutora do meio, relacionada com as concentrações de nitrato, também está relacionada com as concentrações de PG na água, indicando o aumento da concentração de PG em ambientes mais oxidantes. Neste caso, entre os pontos monitorados no rio Atuba, o ponto AT-01, apresentou condição mais oxidante, observada pelas maiores concentrações de nitrato e consequentemente maiores cargas de PG.

Ainda em relação a PG, outra hipótese a ser considerada é a remoção da PG da fase líquida, no processo de tratamento anaeróbio da ETE Atuba Sul, seja por biodegradação anaeróbia ou retenção ao lodo, justificando a presença de menores cargas de PG no ponto AT-03.

Em se tratando de estrogênios nos pontos monitorados no rio Atuba, na coleta de jun/09, período em que foram observadas as menores vazões nos pontos AT-02 e AT-03, foi observado, entre estes dois pontos, uma situação antagônica. Enquanto no ponto AT-02 ocorreu carga máxima de E2 igual a 4,28kg/d, no ponto AT-03 observou-se carga mínima de E2 de 1,72kg/d. Nesta situação pode-se considerar a hipótese de que quando a vazão for baixa, o aumento da carga de E2 no ponto AT-02 está relacionado ao aumento da concentração de E2 resultante da diminuição do volume de esgoto, considerando que o ponto AT-02 é uma fonte contínua de lançamento clandestino de esgoto proveniente do bairro Cajuru. Por outro lado, no ponto AT-03, localizado na saída da ETE Atuba Sul, a baixa

vazão pode ter induzido a um maior tempo de detenção na ETE, o que resultou na redução da carga de E2 após o tratamento na ETE.

Em relação ao E1 e EET no rio Atuba, estes apresentaram uma relação linear positiva ($R = 0,6015$, $p = 0,0228$) indicando serem provenientes da mesma fonte, no caso, esgoto doméstico. Outros indícios desta contaminação foram observados por meio das relações entre estrogênios e nitrogênio amoniacal ($R = 0,5408$, $p = 0,0458$) e estrogênios e zinco ($R = 0,5631$, $p = 0,0359$), que em concentrações de 0,001 a 0,10mg/L, faixa em que se encontram as concentrações obtidas neste estudo, pode ser um indício de contaminação por esgoto doméstico (CETESB, 2009).

As maiores cargas de EET e E1 no rio Atuba foram encontradas na saída da ETE (ponto AT-03), na coleta de fev/09, e foram de 0,66 kg/d para o E1 e de 2,18 kg/d para o EET. Considerando que na campanha de fev/09 houve a menor vazão no ponto AT-03 ($4,27\text{m}^3/\text{s}$), observa-se que a diminuição da vazão neste ponto contribui para a variação das cargas dos estrogênios de forma diferente. Enquanto para o E2, a diminuição da vazão promove diminuição da carga, para o EET e E1, a diminuição da vazão resulta em um aumento da carga. A variação das cargas de estrogênios no esgoto doméstico após entrada nas ETEs está relacionada a diversos fatores que serão discutidos na sequência deste estudo.

Em relação ao Canal Extravisor, foi observado que as maiores cargas para todos os HSFs pesquisados ocorreram na coleta de ago/09, quando foi observada a segunda maior vazão no período estudado, de $4,08\text{m}^3/\text{s}$. As cargas máximas observadas foram de 1,13 kg/d para o E2; 1,40 kg/d para o EET; 0,037 kg/d para o E1 e 0,11 kg/d para o PG (Tabela 14). Estes valores representam indícios de arraste de esgoto das galerias para o Canal, lembrando da existência de ocupações irregulares ao longo do Canal Extravisor, onde o esgoto não é devidamente coletado, e muitas vezes é acumulado em galerias, conforme observado na Figura 37, obtida durante as campanhas de amostragem.

No rio Itaqui, as cargas de HSFs não atingiram 0,10 kg/d, tendo sido o E2 o hormônio observado em maior concentração, na coleta de fev/09 (Tabela 14). Também foi observada a influência do escoamento superficial sobre as cargas de HSFs no rio Itaqui por meio das relações entre vazão e E2 ($R = -0,9573$; $p = 0,0426$), provavelmente tendo ocorrido a mesma variação observada no rio Iguaçu, de diminuição da concentração de E2 (oxidação a E1) devido à oxigenação do meio pelo aumento da vazão (Figura 35).

Apesar de terem sido observados cenários distintos em relação à distribuição espacial e temporal dos HSFs na área de estudo, para a PG foi observado uma particularidade em comum entre os rios Iguaçu, Atuba e Canal Extravisor. Este hormônio apresentou correlações positivas com o OD em todos os casos ($R = 0,7770$, rio Iguaçu; $R = 0,6449$, rio Atuba; $R = 0,9240$, Canal Extravisor; $p < 0,05$), indicando que ambientes com

maior oxigenação são mais propícios a sua presença. A redução da carga de PG em ambientes mais anóxicos pode estar associada à conversão da PG a Pregnanodiol, uma forma reduzida da PG, através da ligação dupla do anel insaturado (Figura 04) (GILMAN, HARDMAN E LIMBIRD, 2003).



FIGURA 37 – EXEMPLO DE GALERIA CONTENDO ESGOTO DOMÉSTICO AO LONGO DO CANAL EXTRAVASOR

FONTE: O AUTOR

Sedimento

Na Tabela 15 são apresentados os resultados das concentrações de HSFs no sedimento dos pontos IG-01, IG-02, AT-02, AT-03 E CP-01, nos pontos AT-01 e IT-01 não foram monitorados, devido à dificuldade em coletar amostras de sedimento.

Assim como nas amostras de água superficial, o E2 foi o hormônio que apresentou as concentrações mais elevadas no sedimento, variando de $< 2,50$ a $137,91 \mu\text{g/kg}$. Para o E1, as concentrações variaram de $< 2,50$ a $42,18 \mu\text{g/kg}$, enquanto para o EET variaram de $< 3,0$ a $35,60 \mu\text{g/kg}$ e de PG variaram de $< 1,50$ a $90,92 \mu\text{g/kg}$ (Tabela 15). Os pontos em que ocorreram as maiores concentrações foram AT-02 (E2 e EET) e AT-03 (E1 e PG), ambos localizados próximos à ETE Atuba Sul, provavelmente, devido à influência do descarte de

esgoto doméstico pela ETE e de forma clandestina a montante e, ainda, em relação ao ponto AT-02, este encontra-se em área de descarte de grande quantidade de resíduos sólidos, provenientes do pré-tratamento (areia e matéria orgânica) da ETE Atuba Sul, característica observada em campo, na coleta de abril/09.

TABELA 15 - CONCENTRAÇÕES DE HSFs ($\mu\text{g/kg}$) NAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO DO RIO IGUAÇU (IG), ATUBA (AT) E CANAL EXTRAVASOR (CP)

Ponto	Coleta	IG-01	IG-02	AT-02	AT-03	CP-01
Parâmetro						
Estradiol (E2)	fev/09	4,75	94,91	66,40	50,22	8,90
	abr/09	--	34,96	105,44	56,38	--
	jun/09	9,63	53,16	34,65	11,75	17,56
	ago/09	18,52	21,30	137,91	69,4	37,03
	out/09	55,17	42,77	125,03	51,53	--
Etinilestradiol (EET)	fev/09	4,89	33,72	5,55	32,65	3,64
	abr/09	--	10,96	15,01	14,62	--
	jun/09	7,08	13,54	30,57	10,40	9,48
	ago/09	3,63	ND	35,60	15,59	ND
	out/09	14,27	24,61	18,25	21,71	--
Estrona (E1)	fev/09	ND	11,18	ND	14,33	12,43
	abr/09	--	25,47	16,16	28,59	--
	jun/09	3,04	6,90	ND	4,05	ND
	ago/09	ND	ND	18,47	42,18	3,85
	out/09	6,63	5,68	9,52	ND	--
Progesterona (PG)	fev/09	32,90	27,72	21,51	24,11	31,41
	abr/09	--	22,61	33,86	88,10	--
	jun/09	25,59	34,45	17,62	64,44	21,93
	ago/09	18,91	23,28	22,43	90,92	ND
	out/09	ND	27,57	52,91	50,03	--

FONTE: O AUTOR

Em relação aos valores da literatura, apresentados na Tabela 16, os resultados de HSFs para os sedimentos, obtidos neste trabalho, foram superiores, na proporção de dez vezes para o E2, e menores que duas vezes para o E1, EET e PG. Estes valores mais elevados foram encontrados nos pontos AT-02 e AT-03, sendo que o ponto AT-03 sofre influência direta da ETE Atuba Sul, indicando, assim, que o tratamento adotado nesta unidade não está sendo, aparentemente, eficiente em relação à remoção de HSFs, enquanto o ponto AT-02, recebe descarte de resíduo sólido da ETE. Com exceção destes pontos, os demais pontos monitorados, apresentaram concentração de E1, EET e PG de acordo com os valores observados na literatura. Para o E2, hormônio que apresentou as maiores concentrações neste estudo, todos os pontos monitorados apresentaram

concentrações mais elevadas, quando comparados aos resultados obtidos por outros autores, citados na Tabela 16.

TABELA 16 - VALORES DE HSFs EM SEDIMENTO ($\mu\text{g/kg}$) OBSERVADOS NA LITERATURA, EM NEGRITO OS MAIORES VALORES

Origem	E2	EET	E1	PG	Fonte
Espanha	< 1,0	22,82	11,88	< 1,0	Petrovice <i>et al.</i> , (2001)
Espanha	nd	4,16 a 22,8	1,32 a 11,9	0,08 a 6,82	Lopez de Alda <i>et al.</i> , (2002)
Alemanha	2,0	0,90	2,0		Thomas <i>et al.</i> , (2002)
EUA				0,09 a 48,8	Jenkins <i>et al.</i> , (2003)
Reino Unido	0,20 a 13,00				Thomas <i>et al.</i> , (2004)
Australia	0,22 a 2,48	<0,05 a 0,50	0,16 a 1,17		Braga <i>et al.</i> , (2005)
Reino Unido	0,03 a 1,20	<0,04	0,40 a 3,30		Labadie e Hill (2006)
Reino Unido			28,8		Labadie <i>et al.</i> , (2007)
Brasil	<2,5 a 137,91	<3,0 a 36,60	<2,5 a 42,18	<1,5 a 90,92	Machado (2010)

A diferença entre os valores de HSFs observados neste estudo e os obtidos na literatura, apresentados na Tabela 16, podem estar associadas às características da área estudada, tais como grande aporte de esgoto doméstico pela ETE Atuba Sul e por lançamentos irregulares; baixa remoção de HSFs pela ETE Atuba Sul, considerando que algumas ETEs podem remover parcelas significativas destes compostos (JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000; KHANAL *et al.*, 2006; SERVOS *et al.* 2005) e ainda, deve ser considerado o contínuo aumento no consumo de anticoncepcionais (FERNANDES, 2007), indicando que maiores concentrações de HSFs poderiam ser encontradas, se novos estudos fossem realizados.

Em geral, na literatura as maiores concentrações de HSFs em sedimento são observadas para o E1 variando de 0,16 a 28,8 $\mu\text{g/kg}$. A justificativa apresentada pelos autores é a conversão de E2 em E1 em ambientes com maiores concentrações de OD, resultando em menores concentrações de E2, que variam de 0,03 a 13,00 $\mu\text{g/kg}$ em diferentes trabalhos publicados (PETROVICE *et al.*, 2001; LOPEZ DE ALDA *et al.*, 2002; LABADIE & HILL 2006). Neste estudo, as concentrações de E2, na faixa de 4,75 a 137,91 $\mu\text{g/kg}$, foram mais elevadas, comparado as concentrações de E1, que foram de 3,04 a 42,18 $\mu\text{g/kg}$, indicando que a oxidação de E2 a E1 não ocorreu.

Muitos estudos têm sido realizados, com o objetivo de avaliar a concentração de estrogênios em ambientes marinhos, sob influência antrópica de lançamento de esgoto doméstico. Hashimoto *et al.* (2005) encontraram concentrações de 1,22 a 14,4 $\mu\text{g/kg}$ de E1 e menores que 0,26 $\mu\text{g/kg}$ para E2 e EET, na Baía de Tokyo – Japão. Houtman *et al.* (2006), observaram concentrações de até 0,37 $\mu\text{g/kg}$ para E1, de 0,17 $\mu\text{g/kg}$ para E2, e menores que 0,55 $\mu\text{g/kg}$ para EET, no Porto de Zierikzee, na Holanda, enquanto Zang *et al.* (2009) obtiveram concentrações de até 7,38 $\mu\text{g/kg}$ de E1; 2,35 $\mu\text{g/kg}$ de E2 e 2,18 $\mu\text{g/kg}$ de EET na

Baía de Xiamen, na China. De acordo com estes valores, observa-se que mesmo em ambientes marinhos, as maiores concentrações de hormônios no sedimento também são obtidas para o E1 em comparação ao E2 e EET.

Neste estudo, para um melhor entendimento do comportamento dos HSFs no meio ambiente, foram calculados os coeficientes de partição (K_d) em cada ponto amostrado, considerando os resultados apresentados nas Tabelas 12 e 15. Convém informar, que os valores de K_{ow} , K_d e K_{oc} , a serem apresentados referem-se, na verdade, ao logaritmo destes coeficientes.

Para o coeficiente de partição sedimento/água (K_d), foram observados valores de 1,54 a 536 L/kg, sendo que os maiores valores foram obtidos para a PG (mínimo de 80,10L/kg; média de $251,84 \pm 190,21$ L/kg; máximo de 536,97L/kg), caracterizando, nas condições ambientais da área estudada, maior afinidade deste composto pelo sedimento e uma menor mobilidade no meio ambiente, quando comparado aos estrogênios, que apresentaram valores de K_d mais baixos (mínimo de 1,65 L/kg; média de $20,70 \pm 40,79$ L/kg; máximo de 201,21L/kg) e são, portanto, mais facilmente transportados nos corpos hídricos.

De acordo com trabalhos desenvolvidos, há uma grande variação nos valores de K_d para os HSFs. Peck *et al.* (2004), observaram valores entre 4 e 74 L/kg; Holthaus *et al.* (2002), obtiveram valores entre 4 e 260 L/kg; Petrovic *et al.* (2001) entre 128 e 479 L/kg e Carballa, Omil e Lema, (2007) entre 400 e 700 L/kg. Entretanto, apesar desta variação, a maior parte dos valores de K_d encontrados neste trabalho (1,54 a 536L/kg) estão de acordo com os valores observados na literatura (4 a 700L/kg). Os valores de K_d obtidos neste estudo, entre 1,54 e 3,73L/kg, encontram-se inferiores àqueles observados na literatura e correspondem ao período de fev/09 e jun/09, indicando que neste período, provavelmente, as características do meio favoreceram a fase aquosa na partição dos HSFs, resultando em menores valores de K_d .

A variação dos valores médios de K_d dos estrogênios nos rios Iguaçu, Atuba e Canal Extravisor é apresentada na Figura 38, indicando que entre os pontos amostrados, o rio, cujas condições ambientais são mais favoráveis à adsorção de estrogênios na fase sólida, foi o rio Atuba. O mesmo ocorreu em relação à Progesterona, sendo o rio Atuba o local em que também ocorreram os valores mais elevados de K_d , entretanto, devido à problemas de escala ocasionado pela grande diferença entre os valores de K_d da progesterona e dos estrogênios (10 a 40 vezes), os valores de K_d da progesterona não foram apresentados na Figura 38.

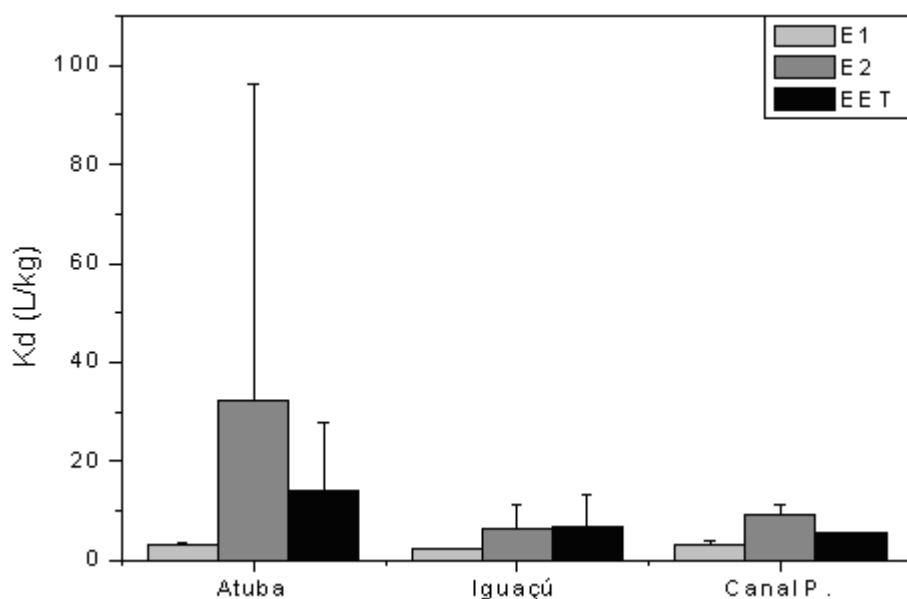


FIGURA 38 - VALORES MÉDIOS DE K_d DOS ESTROGÊNIOS (L/kg) NOS RIOS ATUBA, IGUAÇU E CANAL EXTRAVASOR

FONTE: O AUTOR

Em geral, diversos fatores podem interferir nos valores de K_d dos HSFs, resultando em uma grande variabilidade na literatura atribuída às condições ambientais da área estudada (HASHIMOTO *et al.*, 2005). Estes fatores podem estar relacionados com as características do sistema, como o pH, a salinidade e a quantidade de íons, ou ainda estar relacionados com as características da fase sólida, como o teor de carbono orgânico total (COT) e o tamanho das partículas (BRAGA *et al.*, 2005).

Devido à importância do carbono orgânico na adsorção de HSFs ao sedimento, observada na literatura (LAI *et al.*, 2000; ROBINSON *et al.*, 2009; ZANG *et al.*, 2009) e no intuito de avaliar a força desta adsorção, o coeficiente de distribuição (K_d) foi expresso por K_{oc} , um coeficiente de partição do hormônio, na fração de carbono orgânico total do sedimento. As médias observadas dos valores de K_{oc} foram de $2,94 \pm 0,53$ L/kg (E1), $2,60 \pm 0,50$ L/kg (E2), $2,49 \pm 0,37$ L/kg (EET) e $3,89 \pm 0,53$ L/kg (PG), seguindo a ordem, na adsorção ao sedimento: $PG > E1 > E2 > EET$. De acordo com esta sequência, foi observada maior força de adsorção à fração orgânica do sedimento para a PG e E1. A diferença nesta partição, fração orgânica/água, entre os HSFs pesquisados, deve-se, às propriedades hidrofóbicas de cada hormônio, medida pelos valores de K_{ow} (Tabela 02), associadas às características físico-químicas e limnológicas do meio.

Por meio da correlação linear entre os HSFs e o COT no sedimento, que foi de 0,75 ($p < 0,005$), foi observado que o aumento do teor de COT promove um aumento na concentração de HSFs, no sedimento, corroborando com a correlação observada entre as concentrações de HSFs e teores de argila no sedimento ($R = 0,58$ $p = 0,0050$). No entanto,

esta adsorção de HSFs ao sedimento, observada, apresenta baixa força eletrostática, pois não foi observada correlação linear positiva entre os valores de Koc e os teores de COT do sedimento. Este fato pode estar relacionado com a presença de outros compostos mais hidrofóbicos que os HSFs na área de estudo. Na literatura, Lai *et al.* (2000); Bowman, Zhou e Readman, (2002) e Robinson *et al.* (2009) observaram correlações lineares acima de 0,98 ($p < 0,001$) entre o Koc e teores de COT, indicando que, no ambiente estudado, a adsorção dos HSFs à fração orgânica do sedimento, representada pelos teores de COT, ocorre com maior força eletrostática.

Em relação aos parâmetros limnológicos da água, foram observadas relações lineares negativas entre os HSFs e o ferro ($R = -0,6086$, $p = 0,0026$) e entre HSFs e alumínio ($R = -0,5946$, $p = 0,0035$), indicando um aumento da concentração de HSFs no sedimento com a redução destes metais na água. Lai *et al.* (2000) observaram adsorção de HSFs a óxidos de ferro e alumínio, sugerindo um mecanismo de troca iônica, onde HSFs polares ligam-se aos óxidos destes metais transferindo, desta forma, os HSFs da fração aquosa para o sedimento. Outras relações entre os HSFs e parâmetros limnológicos indicaram influência de lançamento de esgoto, como por exemplo, a correlação entre HSFs e a amônia ($R = 0,5217$, $p = 0,0127$) e entre HSFs e o fósforo total ($R = 0,5010$, $p = 0,0175$).

4.3.3 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NA ETE ATUBA SUL

Neste trabalho, foi realizada uma estimativa da eficiência de redução de HSFs pela ETE Atuba Sul. A Tabela 17 apresenta as concentrações encontradas em amostras do afluente e efluente da ETE de todos os compostos pesquisados e, no caso dos estrogênios, foi avaliada também a concentração após o tratamento anaeróbio. Como pode ser observado na Tabela 17, houve uma redução na concentração de EET (6 a 47%) e de PG (26 a 63%) após o tratamento na ETE. Por outro lado, para o E1 e E2, estrogênios naturais, foram observados incrementos em suas concentrações no efluente em relação às concentrações do afluente da ETE. Estes incrementos foram de 25 a 45% para o E1 e de 8 a 26% para o E2. Em relação a estes dados, deve-se considerar que a coleta do afluente e do efluente foram realizadas no mesmo dia e, portanto podem não corresponder exatamente à mesma carga de HSFs, visto que não foi aguardado, após coleta do afluente, o período de detenção hidráulica do tratamento (sete dias) para coleta do efluente.

Na literatura, alguns estudos reportam a remoção de estrogênios em ETEs, enquanto para a progesterona, estudos sobre sua remoção são mais escassos. Em geral, os tratamentos aeróbios são mais eficientes na remoção de HSFs quando comparados aos tratamentos anaeróbios (LOPEZ, 2007). Em filtro biológico, Ternes *et al.* (1999) obtiveram remoção de 64% de EET na Alemanha, enquanto Johnson, Belfroid e Di Corcia *et al.* (2000),

Khanal *et al.* (2006) e Carballa *et al.* (2007b) obtiveram remoções de 74%, 64% e 0% de estrogênios, por sistema de lodos ativados na Holanda, EUA e Espanha, respectivamente. No Brasil, Ghiselli (2006) obteve remoção de 13% a 17% para os estrogênios e de 17,9% para a progesterona, também em sistemas de lodos ativados.

TABELA 17 - CONCENTRAÇÕES DE HSFs NO AFLUENTE E EFLUENTE DA ETE ATUBA SUL, DE ESTROGÊNIOS APÓS TRATAMENTO ANAERÓBIO E RESPECTIVAS REDUÇÕES E INCREMENTOS NOS VALORES OBSERVADOS

Ponto Parâmetro	Coleta	Afluente (µg/L)	Após Tratam. Anaerobio. (µg/L)	Efluente (µg/L)	Redução (%)	Incremento (%)
E2	jun/09	7,61		4,41	42	
	ago/09	8,66		9,77		11
	out/09	1,97		2,66		26
	out/09	1,83	2,27	2,27		24
	nov/09	1,61	1,71	1,74		8
EET	jun/09	8,66		4,53	47	
	ago/09	3,56		2,94	17	
	out/09	0,67		0,60	10	
	out/09	1,41	1,26	1,06	25	
	nov/09	0,51	0,51	0,48	6	
E1	jun/09	ND		ND	0	0
	ago/09	ND		0,25		25
	out/09	ND		0,45		45
	out/09	0,63	0,89	0,90		43
	nov/09	ND	ND	ND		
PG	jun/09	0,32		0,12	63	
	ago/09	0,50		0,37	26	
	out/09	0,17		0,10	41	

FONTE: O AUTOR

Em tratamentos anaeróbios, Lee e Liu (2002) obtiveram, em uma ETE no Canadá, remoção de 50% de E2 após sete dias de tratamento, Servos *et al.* (2005) obtiveram, em ETEs, também no Canadá, remoções de 68% e 66% para E2 e E1 respectivamente, por tratamento em lagoa anaeróbia, enquanto Carballa, Omil e Lema (2007) observaram 90% de remoção de EET em tratamento anaeróbio de bancada.

Assim, as estimativas de redução de HSFs na ETE Atuba Sul de 6% a 63% (Tabela 17), observadas neste estudo, estão de acordo com a literatura, sendo que a redução da concentração depende do hormônio e do processo de tratamento utilizado na ETE. Entretanto, a redução dos valores observados neste estudo não corresponde, necessariamente, à degradação dos hormônios pesquisados. De acordo com Gesel *et al.*

(2001), a biodegradação completa dos HSFs depende da destruição do anel fenólico e, conseqüente, formação de metabólitos, sendo que a comprovação da formação destes metabólitos não foi realizada neste estudo. Além disso, de acordo com Carballa *et al.* (2004) e Hutchins *et al.* (2007), dependendo das condições oxidantes/redutoras do meio, pode ocorrer a conversão de um estrogênio em outro, conforme suposto ter ocorrido no rio Iguaçu em relação ao aumento da concentração de E1 com a diminuição da concentração de E2.

Após análise de HSFs nos três tipos de lodo produzidos na ETE Atuba Sul (out/09), as baixas concentrações encontradas, indicaram que em relação aos estrogênios, não ocorre na ETE, uma transferência significativa dos poluentes para o lodo. Convém lembrar, que foi realizada apenas uma coleta de amostras.

As concentrações de estrogênios identificadas no lodo proveniente do tratamento anaeróbio foram de 126,66µg/kg, para o E2, 133,10µg/kg para o EET e menor que 2,5µg/kg, para a E1. No lodo proveniente do processo de caleação, as concentrações foram de 13,03µg/kg, para o E2; de 89,36µg/kg, para o EET e menor que 2,5µg/kg para a E1, evidenciando, uma redução de 90% e 33% para o E2 e EET respectivamente, após adição de cal. Convém lembrar que, a redução de estrogênios após caleação é apenas uma estimativa, e não considera a mesma porção de lodo avaliada antes e após a adição de cal, nem a degradação natural dos estrogênios que, também pode ocorrer no período em que o lodo, após a adição de cal, fica armazenado, este período pode ser de até 60 dias. No lodo proveniente do tratamento físico-químico, não foram detectadas concentrações de estrogênios.

Considerando a natureza hidrofóbica dos estrogênios, espera-se que a atuação de mecanismos de adsorção destes compostos às partículas sólidas resulte em remoção eficiente da fração aquosa e enriquecimento do lodo de esgoto. Entretanto, de acordo com os resultados observados neste estudo e na literatura, observa-se que a remoção eficiente nem sempre ocorre (LOPEZ, 2007, GHISELLI, 2006, LEE E LIU, 2002; CARBALLA *et al.*, 2007). Lai *et al.* (2000), em estudos de partição entre sedimento e água, simulando várias condições ambientais, sugerem que o motivo pelo qual a eficiência não ocorre deve-se à competição dos estrogênios com compostos mais hidrofóbicos, pelos sítios ativos dos sólidos em suspensão. Uma vez que ocorra a saturação destes sítios, o potencial de remoção torna-se nulo.

De acordo com Johnson e Williams (2004), a adsorção do HSFs aos sólidos suspensos só ocorre quando as suas concentrações forem maiores que 3g/L. Para Holthaus *et al.* (2002), os sólidos suspensos são responsáveis pela remoção de menos de 1% dos HSFs presentes na fase aquosa. Assim, a competição pelos sítios ativos, a sua respectiva saturação e ainda a alta solubilidade podem ser os responsáveis pela concentração de estrogênios que permanece na fase aquosa (SCHÄFER, NGHIE E WAITE, 2003).

Além da competição e características físico-químicas dos estrogênios, outros fatores podem influenciar na sua remoção nas ETEs, tais como: a carga aplicada, a temperatura e o tempo de detenção hidráulico (TERNES *et al.*, 1999, JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA, 2000). Para Khanal *et al.* (2006), o motivo da maior eficiência na redução de HSFs, do sistema de lodos ativados deve-se à nitrificação que ocorre em tempos de detenção hidráulico maiores do que 10 dias (CARBALLA, OMIL E LEMA, 2007).

Por outro lado, em relação à PG, a adsorção ao lodo gerado no sistema de tratamento mostrou-se bem mais intensa, considerando a amostragem única realizada. A concentração de PG encontrada no lodo anaeróbio foi de 2.230,89µg/kg, enquanto no lodo, após a adição de cal, foi de 229,30µg/kg. No lodo proveniente do tratamento físico-químico, foi observada a concentração de 59,67µg/kg.

Como mencionado anteriormente, a estrutura molecular da PG apresenta algumas diferenças em relação aos estrogênios, no que diz respeito ao grupo funcional e massa molecular (Figura 02 e Tabela 02). Estas características individuais, associadas às características químicas do meio, principalmente concentração de OD e de nitrato, provavelmente, são responsáveis pela maior afinidade deste hormônio pela fração sólida, o que acarreta maiores concentrações de PG, tanto no lodo como no sedimento. A maior tendência da PG à adsorção na fase sólida foi observada por meio dos valores de K_d , que foram mais elevados que os valores de K_d dos estrogênios na partição sedimento/água, e nas concentrações elevadas de PG encontradas no lodo proveniente do tratamento anaeróbio.

Os resultados obtidos neste estudo, para a PG em água, sedimento e parâmetros limnológicos, sugerem que as características químicas do meio, que promovem a diminuição da concentração da PG na forma dissolvida, são baixas concentrações de OD e de nitrato. Esta hipótese é baseada nas relações positivas observadas entre a concentração de PG e de OD na água, em quase todos os pontos monitorados e na relação entre a concentração de PG e de nitrato na água, observada nos pontos monitorados no rio Atuba. Corroboram com estas relações, as elevadas concentrações de PG na água encontradas no ponto AT-01, o qual apresentou também elevadas concentrações de nitrato. Por outro lado, os pontos AT-02 e AT-03, que apresentaram menores concentrações de nitrato, apresentaram também, menores concentrações de PG na água, e maiores concentrações de PG no sedimento, comparado ao ponto AT-01.

Associando os resultados das concentrações de PG, observados nas amostras de água e sedimento, com as elevadas concentrações encontradas no lodo, proveniente do tratamento anaeróbio, supõe-se que, em meio anóxico, com baixas concentrações de nitrato, ocorre diminuição da concentração da PG na água, seja por adsorção ao sedimento ou redução da ligação dupla do anel insaturado da molécula de PG (Figura 04), gerando o

metabólito Pregnanodiol. Em condições anaeróbias, com concentrações de nitrato consideravelmente baixas, como na ETE Atuba Sul, por exemplo, ocorre uma potencialização da adsorção da PG à fase sólida, justificando assim, as maiores concentrações de PG encontradas no lodo. Corroboram com esta hipótese os resultados obtidos por Carballa *et al.* (2007), em testes de remoção de HSFs por sistemas anaeróbios, onde a eficiência do processo apresentou dependência da concentração de nitrato do meio aquoso.

Em relação aos incrementos de E1 e E2 no efluente em relação ao afluente da ETE (Tabela 17), também foram observados por Servos *et al.* (2005), Andersen *et al.* (2003) e Carballa, Omil e Lema (2007) no Canadá, Alemanha e Espanha, respectivamente. Estes autores associaram o fato à conversão dos estrogênios após a entrada na ETE. Quando eliminados, os estrogênios apresentam-se em sua forma inativa de glucuronídeos e sulfatos. Entretanto, imediatamente após a entrada do afluente na ETE, ocorre conversão destas formas inativas em formas ativas de estrogênios (Figura 05), devido ao contato com a elevada população de *Escherichia coli*, eliminada em grandes quantidades nas fezes e produtora das enzimas glucuronidase e arilsulfatase, conforme observado por D'Ascenzo *et al.* (2003) e , Khanal *et al.* (2006).

Este processo de quebra da conjugação pode ocorrer também antes da entrada na ETE, no percurso do esgoto entre as residências e a ETE. Dessa forma, a rede coletora e as ETEs podem ser consideradas reatores que convertem estrogênios da forma inativa (conjugada) em ativa (livre) (D'ASCENZO *et al.*, 2003).

Os incrementos nas concentrações de E1 e de E2, observados neste estudo, foram de 8 a 45%. De acordo com Adler, Steger-Hartman e Kalbfus (2001), o incremento de estrogênios naturais pode ser de até 67%, após entrada na ETE. Neste estudo, os incrementos de E1 e E2 ocorreram anteriormente ou exatamente no tratamento anaeróbio (Tabela 17). Como foi observado, Carballa *et al.* (2004) afirmam que o aumento da concentração dos estrogênios ocorre durante o tratamento primário, mais especificamente no sedimentador. Por outro lado, D'Ascenzo *et al.* (2003) consideram que a desconjugação pode ocorrer tanto no tratamento primário como em outras etapas do tratamento.

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES

Considerando o corpo aquático como um sistema complexo, mais complexo ainda é a sua bacia, onde ocorrem interações entre vários rios com diferentes características, além do uso e ocupação do solo. Este cenário foi observado entre os rios avaliados neste estudo no que diz respeito aos HSFs. Cada rio avaliado apresentou um comportamento diferente em relação à presença destes compostos, de acordo com a composição química da água e características locais, evidenciando a interferência destes fatores na concentração de HSFs em cada local. Sendo a bacia hidrográfica considerada como a unidade de planejamento, atenta-se para a complexidade para gerir tal sistema, diante de tantas particularidades.

O presente trabalho avaliou a qualidade da água na bacia do Alto Iguaçu, na região Metropolitana de Curitiba, por meio da análise de parâmetros limnológicos e da determinação das concentrações de HSFs e mostrou que o lançamento de efluentes domésticos, com ou sem tratamento prévio, tem afetado significativamente a qualidade da água deste trecho da bacia do Iguaçu. Isso implica na deterioração das condições ideais para a sobrevivência dos organismos aquáticos e consequências sobre a saúde pública. Hormônios sexuais femininos tipicamente encontrados nos efluentes domésticos foram identificados e quantificados nas águas da bacia do Alto Iguaçu. As elevadas concentrações encontradas, tanto para água como para sedimento, refletem a influência antrópica sobre a qual, a região está submetida. Para atenuação deste quadro, percebe-se a necessidade de investimentos significativos que contemplem, primeiramente, a coleta e o tratamento do esgoto doméstico gerado na cidade de Curitiba e Região Metropolitana e, também, o aprimoramento dos sistemas de tratamento de esgoto, com vistas à degradação de compostos tóxicos em baixas concentrações, como é o caso dos HSFs.

Entre os locais mais afetados estão o rio Iguaçu, após a confluência com o rio Atuba, e o próprio rio Atuba, devido, provavelmente, ao lançamento irregular de esgoto doméstico na região e à proximidade com a ETE Atuba Sul, que de acordo com estimativas realizadas neste estudo, não apresenta em seu tratamento eficiência adequada para a remoção de nutrientes nem de HSFs. O que ocorre na ETE, de acordo com os resultados observados neste estudo, é a conversão de alguns hormônios em outros, de mesmo potencial tóxico, durante o tratamento; a conversão de formas inativas em formas ativas e a transferência de hormônios para o lodo.

Além da ETE, características referentes ao comportamento dos HSFs no meio ambiente também foram observadas, tais como a mobilidade de estrogênios na forma dissolvida em função de baixos valores de coeficiente de partição (K_d) e a tendência da

progesterona à redução e adsorção à fração sólida, em meio anóxico ou anaeróbio, e sua relação com a concentração de nitrato do meio. Estes dados contribuem para com o papel da comunidade científica perante os problemas de saúde pública e saneamento, cuja importância está voltada à produção de conhecimento científico, passível de ser utilizado no aprimoramento de novas tecnologias, destinadas a resolver ou ao menos amenizar tais problemas.

Em relação às metodologias analíticas utilizadas na produção dos resultados, foi demonstrada a sua efetividade na identificação e quantificação tanto dos HSFs como dos parâmetros limnológicos avaliados. A disponibilização de métodos analíticos de HSFs em matrizes de água superficial e sedimento, validados, contribui para o acervo de técnicas de monitoramento, disponíveis para serem utilizadas em instituições de pesquisa, e ainda promove um incentivo à pesquisa voltada para o monitoramento de compostos emergentes, tais como os HSFs, considerando a carência do Brasil, em especial o Estado do Paraná, no monitoramento de compostos tóxicos em baixas concentrações.

Em geral os resultados produzidos neste trabalho estão relacionados com a questão ambiental e dos impactos das modificações ambientais nos ecossistemas naturais e suas consequências no agravo à saúde pública, tendo como enfoque a relação das condições dos recursos hídricos com os padrões de consumo da população, mais especificamente a população feminina. Percebe-se a necessidade de se compatibilizar as ações humanas com a proteção do meio ambiente, resultando em uma convivência mais justa e equilibrada, pois juntamente com HSFs, outros compostos também se apresentam nas mesmas condições de toxicidade e são provenientes do lançamento de esgoto, tais como: antibióticos, bisfenol, ácido acetilsalicílico, paracetamol, diclofenaco, ibuprofeno, entre outros fármacos e componentes de produtos de higiene e beleza, responsáveis por uma série de efeitos nocivos à biota aquática e ao homem.

Como principal legado deste trabalho fica a consciência do círculo vicioso provocado pelo desequilíbrio entre os interesses da sociedade e a proteção ao meio ambiente, citando como exemplo o uso de anticoncepcionais, onde uma prática de controle da natalidade é capaz de promover, à longo prazo, uma geração incapaz de se reproduzir.

5.2 RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Considerando o pioneirismo deste trabalho no Paraná, uma vez que até o momento não existe relato da publicação de resultados de pesquisa, sobre a ocorrência de HSFs em matrizes ambientais, outros estudos podem ser realizados como continuidade ou ainda como aprimoramento deste.

Como sugestão para trabalhos futuros são apresentados:

- o aprimoramento dos procedimentos analíticos, objetivando a separação e detecção de todos os hormônios aqui estudados, em uma mesma corrida cromatográfica e ainda atingir menores limites de quantificação;
- realizar estudos mais abrangentes, destas substâncias e outras do mesmo grupo de interferentes endócrinos, em outros corpos hídricos ou ainda em águas subterrâneas, principalmente aquelas destinadas ao abastecimento público;
- realizar melhor avaliação da eficiência de estações de tratamento de esgoto na remoção de HSFs, considerando que neste trabalho foi realizada apenas uma estimativa desta remoção;
- realizar estudos de derivados provenientes da degradação de HSFs, na ETE e nas matrizes ambientais água superficial e sedimento;
- realizar ensaios com métodos de tratamento complementares, capazes de promover maiores eficiências na degradação de HSFs nas ETEs;
- realizar testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos ou outros tipos de organismos, testes estes, capazes de detectar os efeitos de interferência endócrina causados pelos HSFs;
- finalmente, devido às elevadas concentrações de HSFs observadas neste estudo, recomenda-se a avaliação das águas tratadas dos mananciais aqui estudados, para monitorar os níveis de exposição da população abastecida.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, P.; STEGER-HARTMANN, T.; KALBFUS, W. *Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from* southern and middle Germany. **Acta Hydrochim. Hydrobiol**, v. 29, p. 227-241, 2001.

AHMAD, S. R.; REYNOLDS, D. M. Synchronous fluorescence spectroscopy of wastewater and some potential constituents. **Water Research**, v. 29, p. 1599-1602, 1995.

ANDERSEN, H.; SIEGRIST, H.; HALLING-SORENSEN, B.; TERNES, T. Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant. **Environmental Science e Technology**, v. 37, n. 18, p. 4021-4026, 2003.

ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução nº 475, de 19/03/2002, disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2002/475_02re.htm, acessado em 8 de setembro de 2009.

ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução nº 899, de 29/05/2003, disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>, acessada em 8 de setembro de 2009.

APHA - **STANDARD METHODS FROM THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER**, 20. Ed. Washington, 1998.

ARAÚJO C., J. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. 84f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química - Universidade de São Carlos, São Paulo, 2006.

ARNON, S.; DAHAN, O.; ELHANANY, S.; COHEN, K.; PANKRATOV, I.; GROSS, A.; RONEN, Z.; BARAM, S. AND SHORE, L. Transport of Testosterone and Estrogen from Dairy-Farm Waste Lagoons to Groundwater. **Environmental. Sciences. Technology**, v. 42, p. 5521–5526, 2008.

AZEVEDO, J. C. R.; PAGIORO, T. A.; DIAS, L. N.; WOSIACK, A. C. e MOTTER, E. Monitoramento da qualidade das águas de alguns afluentes do rio Iguaçu na região metropolitana de Curitiba – PR In Anais do XI **Congresso Brasileiro de Limnologia**, Macaé SBL, p. 1 – 1, 2007.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2.Ed. Porto Alegre: Bookman, p. 622, 2002.

BAREL-COHEN, K.; SHORE, L. S.; SHEMESH, M.; WENZEL, A.; MUELLER, J.; KRONFELD-SCHOR, N. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. **Journal of Environmental Management**, v. 78, n. 1, p. 16-23, 2006.

BECK, I.C.; BRUHN, R.; GANDRASS J.; RUCK W. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. **Journal of Chromatography**, v. 1090, p. 98–106, 2005.

BELFROID, A.C.; VAN DER HORST A.; VETHAAK A.D.; SCHAFER, RIJS G.B.J, WEGENER J.; COFINO W.P. Analysis and Occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 101–108, 1999.

BIACHI, S.R.; MIYAZAWA, M.; OLIVEIRA, E.L.; PAVAN, M.A. Características da matéria Orgânica no perfil do Solo. In XII Encontro de Química da Região Sul, **Sociedade Brasileira de Química**, QA – 053, 2004.

BIBBO, M.; HAENSZEL, W. M.; WIED, G. L.; HUBBY, M.; HERBST, A. L. A ,twenty-five-year follow-up study of women exposed to diethylsbestrol during pregnancy. **New England Journal of Medicine**, v.298, p.763-767, 1978.

BIRKETT J. W.; LESTER J. N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes**; ISBN 1-56670-601-7, 2003. Disponível em www.crcpress.com. Acessado em 21 de março de 2009.

BOWMAN J.C.; ZHOU J.L.; READMAN J.W.; Sediment-water interactions of natural oestrogens under estuarine conditions. **Mar Chem** , v. 77, p. 263–276, 2002.

BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA, and Ontario, Canada. **Science of the Total Environment**, v. 311, p. 135- 149, 2003.

BRAGA, O.; SMYTHE, G. A.; SCHAFER, A. I.; FEITZ, A. J. Steroid estrogens in ocean sediments. **Chemosphere**, v. 61, p. 827–833, 2005.

BRASIL, 2007. Lei nº 11.445 de 05 de janeiro de 2007 que estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico, disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/l11445.htm, acessado em 10 de fevereiro de 2010.

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. Jr.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; CALDAS, E. P. A.; VALE, M. L. B. F. Validação de Métodos Analíticos: Uma Breve Revisão. **Caderno de Pesquisa**, v. 12, n.1/2, p.116-131, 2001.

CARBALLA, M.; OMIL, F.;LEMA, J. M.; LHOMPART, M.; GARCIA-JARES, C.; RODRIGUES, I.; GOMES, M.; TERNES, T.. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, **Water Research**, v. 38, p. 2918–2926, 2004.

CARBALLA, M.; MANTEROLE, G.;LARREA, L.; TERNES, T.; OMIL, F.; LEMA, J. Fate of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge, **Water Research**, v. 41, p. 2139 – 2150, 2007.

CARBALLA, M.; MANTEROLA, G.; LARREA, L.; TERNES, T.; OMIL, F.; LEMA, J. Influence of ozone pre-treatment on sludge anaerobic digestion: Removal of pharmaceutical and personal care products. **Chemosphere**, v. 67, p. 1444–1452, 2007b.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J.M. Calculation Methods to Perform Mass Balances of Micropollutants in Sewage Treatment Plants. Application to Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs). **Environmental. Science Technology**, v. 41, p. 884-890, 2007.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J.M.. Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. **Chemosphere**, v 72, p. 1118–1123, 2008.

CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: Fundamentos Teóricos, Métodos de Estudo e Análises Químicas**. São Paulo: Edgar Blucher: FAPESP, p. 253, 1994.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, Parâmetros Limnológicos, disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>, acessado em 15 de agosto de 2009.

CHAMPE P. C.; HARVEY R.A.; FERRIER D.R. **Bioquímica Ilustrada**, 3º Edição, Editora Artmed, 2006

CHEN, J. GU, B.; LEBOEUF, E. J.; PAN, H.; DAI, S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. **Chemosphere**, v. 48, p. 59-68, 2002.

COLUCCI, M. S.; BORK, H. e TOPP, E. Persistence of Estrogenic Hormones in Agricultural Soils: I. 17 β -Estradiol and Estrone. **Journal Environmental Qual.**, v. 30, p. 2070 - 2076, 2001.

D'AGOSTINHO E FLUES. Determinação do coeficiente de distribuição (Kd) de benzo(a)pireno em solo por isotermas de sorção. **Química Nova**, v. 29, no. 4, 2006

D'ASCENZO, A.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **The Science of the Total Environment**, v. 302, p. 199–209, 2003.

DEGANI A.L.G.; CASS Q.B.; e VIEIRA P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 34-36, Maio 1998.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluents. *Environ. Science. Technology.*, v.32, p.1549-1558, 1998.

ELSKUS, A. Estradiol and estriol suppress CYP1A expression in rainbow trout primary hepatocytes. **Marine Environmental Research**, v.58, p. 463–467, 2004.'

USEPA – ENVIRONMENTAL AGENCY. **Soil Screening Guidance: User's Guide**. United States Office of Solid Waste and Publication 9355, p. 4-23, Second Edition, 1996.

FALONE, S. **Desenvolvimento de Métodos para determinação do hormônio 17 alfa metiltestosterona em amostras de água e sedimento de piscicultura: ensaios toxicológicos com cladóceros**. 179f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) Departamento de Engenharia Ambiental - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

FENT, K. Endocrinically active substances in the environment: findings and problems. In: GIES, A. (Org.). **Endocrinically active chemicals in the environment**. Berlin: Federal Environmental Agency, p. 69-81, 1996.

FERNANDES, R. **Estudos de remoção de 17 α -Ethinilestradiol de Águas para Abastecimento, utilizando Dióxido de Cloro, Hipoclorito de Sódio, Carvão Ativado em Pó e Tratamento Físico-Químico**. 180f. Dissertação Mestrado em Engenharia Civil), Departamento de Engenharia Civil-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007

FERRARI, G.; MINGAZZINI, M. Synchronous fluorescence spectra of dissolved organic matter of algal origin in marine coastal waters. **Mar. Ecol.: Prog. Ser.**, v. 125, p. 305–315, 1995.

FORSTMEIER W. Quantitative genetics and behavioural correlates of digit ratio in the zebra finch. **Proceedings of the Royal Society**, v. 272, p. 2641–2649, 2005.

FRY, A.; SUMIDA K.; DUDEK B.C.; HAMEY J.P.; LYDON B.W.; MALLEY D.W.; RHODES M.E.. Progesterone's effects to reduce anxiety behavior of aged mice do not require actions via intracellular progestin receptors. **Psychopharmacology**, v. 186, p. 312–322, March, 2006.

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos** (Apostila); 1999.

GESELL, M.; HAMMER, E.; SPECHT, M.; FRANCKE, W.; SCHAUER, F. Biotransformation of biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and characterization of ring cleavage products. **Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1551-1557, 2001.

GHISELLI, G. **Avaliação da Qualidade das Águas destinadas ao Abastecimento Público na Região de Campinas, Ocorrência e Determinação dos Interferentes Endócrinos, Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal**. Tese (Doutorado em Química Analítica) Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Setembro, 2006.

GHISELLI, G. Interferentes Endócrinos no Ambiente, **Química Nova**, v.32, p.127-132, 2007

GILMAN, A., G.; HARDMAN, J. E.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 Edição. Editora Mc Graw Hill, p. 8153-8145, Rio de Janeiro, 2003.

GIORDANO, G. **Tratamento e Controle de Efluentes Industriais**. Rio de Janeiro: Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da UFRJ, p. 218-229, 1999.

GOLDEFIEN, A. In: KATZUNG, B.G., ed. **Basic e Clinical Pharmacology**. 6.ed. Norwalk: Appleton e Lange: Prentice-Hall International, p. 608-636, 1995.

GOMES, R. L.; AVCIOGLU, E.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case in method development. **Trends in Analytical Chemistry**, v.23, n.10-11, p.737-743, 2004.

GUTENDORF B.; WESTENDORF J. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens; **Toxicology**; 166; 79-89; 2001.

HAHLBECK E.; GRIFFITHS R.; BENGTSSON B.E. The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption I. Sexual differentiation. **Aquatic Toxicology**, v.70, p. 287–310, 2004.

HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F., LUTZHOFT, H. C. H.; JORGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357-393, 1998.

HASHIMOTO, S.; AKATSUKA, Y.; KURIHARA, R.; MATSUOKA, S.; NAKATSUKURI, M.; KUOKAWA, Y.; TANI, Y.; KAWAI, S.I. Evaluation of the Ishikawa cell line Bioassay for the detection of Estrogenic substances from sediment extracts. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 1587–1593, 2005.

HEALEY R., LUKE; BASS H., ANDREW. A rapid neuromodulatory role for steroid hormones in the control of reproductive behavior. **Brain Research**, v. 1126, p. 27-35, July, 2006.

HEISTERKAMP I. GANDRASS J., RUCK W. Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC–MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples? **Anal Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 709–715, 2004.

HIDALGO M. Margarete, **Cistos Ovarianos Funcionais em Usuárias de Implantes Contraceptivos Liberadores de Etonogestrel ou Levonorgestrel**. 79f, Tese (Doutorado em Tocoginecologia) Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campina, São Paulo, 2005.

HOLTHAUS, K. I. E.; JOHNSON, S. C.; JURGENS, M. D.; WILLIAMS, R. J.; SMITH, J. J. L.; CARTER, J. E. The potencial for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 2526-2535, 2002.

HOUTMAN, C.J.; BOIJ, P.; JOVER, E.; PASCUAL DEL RIO, D.; SWART, K.; VELZEN, M.; VREULS, R.; LEGLER, J.; BROUWER, A.; LAMOREE, M. Estrogenic and dioxin-like compounds in sediment from Zierikzee harbour identified with CALUX assay-directed fractionation combined with one and two dimensional gas chromatography analyses. **Chemosphere**, v. 65, n°11, p. 2244-2252, 2006.

HUTCHINS, S.R.; WHITE, M.; HUDSON, F.; FINE, D. Analysis of Lagoon Samples from Different Concentrated Animal Feeding Operations for Estrogens and Estrogen Conjugates. **Environmental. Sciences. Technology**, v. 41, p. 738-744, 2007.

IAP – INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ, disponível em www.iap.pr.gov.br, acessado em 15 de agosto de 2009.

INADERA, H. The Immune System as a Target for Environmental Chemicals: Xenoestrogens and other Compounds. **Toxicology Letters**, v. 164, p.191–206, 2006.

INGRAND V.; HERRY G.; BEAUSSE J.; ROUBIN M.R. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Recherche-Vivendi Water**, Emerging Parameters, Saint Maurice, France, August, 2003.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos; DOQ-CGCRE-008, março de 2003.

IPPUC-INSTITUTO DE PESQUISA E PLANEJAMENTO URBANO DE CURITIBA, disponível em www.ippuc.org.br, acessado em 10 de março de 2010.

JENKINS, R.; WILSON, E.M.; ANGUS, R.; HOWEL, W.M.; KIRK, M. Androstenedione and Progesterone in the Sediment of a River Receiving Paper Mill Effluent. **Toxicological Sciences**, v. 73, p. 53–59, 2003.

JOHNSON A. C.; BELFROID A.; DI CORCIA A. Estimating steroid oestrogen input into activated sludge treatment works and observation on their removal from the effluent.; **Science Total Environment**; v. 256; p.163- 173; 2000.

JOHNSON E WILLIAMS. A Model to Estimate Influent and Effluent Concentrations of Estradiol, Estrone, and Ethinylestradiol at Sewage Treatment Works. **Environmental. Sciences. Technology**, v. 38, p. 3649-3658, 2004.

JOLLY C.; KATSIADAKI L.; LE BELLE N.; MAYER L.; DUFOUR S. Development of a stickleback kidney cell culture assay for the screening of androgenic and anti-androgenic endocrine disrupters. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 158–166, 2006.

JOSS, A.; ANDERSEN, H.; TERNES, T.; RICHLE, P. AND SIEGRIST, H. Removal of Estrogens in Municipal Wastewater Treatment under Aerobic and Anaerobic Conditions: Consequences for Plant Optimization. **Environmental Science Technology**, v. 38, p.3047-3055, 2004.

JÜRGENS, M. D.; HOLTHAUS, K. I. E.; JOHNSON, A. C.; SMITH, J. J. L.; HETHERIDGE, M.; WILLIAMS, R. J. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. **Environmental Toxicology e Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 480-488, 2002.

JURGENS, M.D.; WILLIAMS, R.J.; JOHNSON, A.C. Fate and behaviour of steroid oestrogens in rivers. **Research and Development Technical**, Report P161 for the Environment, 2006.

KASSAB, N. **Determinação de Hormônios Esteróides em Contraceptivos orais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**. 201f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

KHAN M.N.; REDDY P.K.; RENA R.L e LEATHERLAND J.F. Application of HPLC Methods to Identify Plasma Profiles of 1 I-Oxygenated Androgens and Other Steroids in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) During Gonadal Recrudescence. **Comp. Biochem. Physiology**, v. 118, n.2, p. 221-227, 1997.

KHANAL, S.K.; XIE, B.; THOMPSON, M.L.; SUNG, S.; ONG, S.K.; LEEUWEN, V. Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. **Environmental Science e Technology**, v. 40, n. 21, p. 6547-6556, 2006.

KIDD, K. Hormônios Femininos ameaçam Peixes, **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 2, p.6-10, Maio, 2007.

KIRK J.C., BOTTOMLEV, L., MINICAM N., CARPENTER H., SHAW S., KOHLI N., WINTER M., TAYLOR E.W., WARING R.H., MICHELANGELI F., HARRIS R.M. Environmental endocrine disrupters dysregulate estrogen metabolism and Ca^{+2} homeostasis in fish and mammals via receptor-independent mechanisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 135, p.1–8, January, 2003.

KNAPIK, H. G. **Modelagem da Qualidade da Água da Bacia do Alto Iguaçu: Monitoramento e Calibração**. 130 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

KNAPIK, H. G. **Reflexões sobre Monitoramento, Modelagem e Calibração na Gestão de Recursos Hídricos: Estudo de Caso da Qualidade da Água da Bacia do Alto Iguaçu**. 180f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental), Departamento de Hidráulica e Saneamento-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KOPLIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. **Environmental. Science. Technology**, v. 36, p.1202-1211, 2002.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 3201-3206, 2001.

LA MORA A.N.; CHATTERTON R.T.; CHOUDHURY O.A.; NAPOLITANO D.A.; BENTLEY G.R. Childhood Conditions Influence Adult Progesterone Levels. **Plos Medicine**, v.4, n 167, p. 813-821, 2007.

LABADIE, P. e HILL, E. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry: Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. v. 9, p. 174-181, 2007.

LABADIE, P.; CUNDY, A.B.; STONE, K.; ANDREWS, M.; VALBONESI, S.;HILL, E.M. Evidence for the Migration of Steroidal Estrogens through River Bed Sediments. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 4299–4304, 2007.

LAI, K. M.; JOHNSON, K. L.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Binding waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 18, p. 3890-3894, 2000.

LARSSON, D. G. J.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKONEN, J.; PETTERSSON, M.; BERG, A. H.; OLSSON, P. E.; FORLIN, L. Ethinyloestradiol – an undesired fish contraceptive? **Aquatic Toxicology**, v. 45, p. 91-97, 1999.

LEE E LIU. Degradation of 17 β -Estradiol and its Metabolites by Sewage bacteria. **Water, Air, and Soil Pollution**, v 134, p.353–368, 2002.

LEITE, F. **Validação em Análises Químicas**. Editora Átomo, p. 46-58, Campinas, 1996.

LINTELMANN J.; KATAYAMA A.; KURIHARA N. Endocrine disruptors in the environment.; **Pure Appl.Chem.**; v. 75; p.631-681; 2003.

LIU Z.H.; ITO M.; KANJO Y.; YAMAMOTO A. Profile and removal of endocrine disrupting chemicals by using an ER/AR competitive ligand binding assay and chemical analyses. **Journal of Environmental Sciences**, v.21, p. 900–906, 2009.

LOPES, L. **Estudo sobre a Ocorrência de Estrogênios em Águas Naturais e Tratadas da Região de Jaboticabal – SP**, 1227f, Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

LÓPEZ DE ALDA, M.; GIL, A.; PAZ, E.; BARCELÓ, D.. Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Analyst**, v. 127, p.1299–1304, 2002.

MA, H.; ALLEN, H. E.; YIN, Y. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. **Water Research**, v. 35, n. 04, p. 985-996, 2001.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução normativa nº 46**, de 10 de junho de 2003 – Regulamento Técnico MERCOSUL sobre critérios para validação de métodos analíticos. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>. Acesso em: 24 de agosto de 2009.

MCKNIGHT, D.M.; BOYER, E.W.; WESTERHOFF, P.K.; DORAN, P.T.; KULBE, T. E ANDERSEN, D.T. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. **Limnology and Oceanography**, v. 46, p. 38-48, 2001.

MERCOSUL. **Instrução Normativa nº 46** de 10 de junho de 2003 intitulada como Regulamento Técnico Mercosul sobre critérios para validação de métodos analíticos.

MOZAZ, R.S.; ALDA, M. J. T.; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 1045, p. 85-92, 2004.

NASSIF M. C.; CIMAROSTI H. I.; ZAMIN L. L.; SALBEGO C. G. Estrógeno versus isquemia cerebral: hormônio feminino como Agente Neuroprodutor. **Infarma**; v. 17; 57-65; 2005.

NGHIEM, L.; SCHAFER, A.; ELIMELECH, M. Removal of natural hormones by nanofiltration membranes: measurement, modeling and mechanisms. (2004). Disponível em <http://www.yale.edu/env/elimelech/PosterRemovalHormonesNF.pdf>. Acessado em 15 de setembro de 2009.

OKHO, Y.; JUCHI, K.-I.; NIWA, C.; TATSUMA, T.; NAKASHIMA, T.; IGUCHI, T.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. 17 β -Estradiol Degradation by TiO_2 Photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 19, p. 4175-4181, 2002.

PECK, M.; GIBSON, R.W.; KORTENKAMP, A.; HILL, E. Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom Rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 945-952, 2004.

PERSHE, L. Aumenta o Consumo de Anticoncepcionais no Brasil, **Revista Health Latin América**, Publicação em Setembro de 2000. Disponível em www.boasaude.uol.com.br. Acessado em 4 de dezembro de 2008.

PESEK J.; MATYSKA, M. T. SPE adsorbents and formats. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.). Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications. New York: Marcel Dekker, p. 19-37, 2000.

PETERSON, E. W.; DAVIS, R. K.; ORNDORFF, H. A. 17 β -estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled Karst Aquifers. **Journal Environmental Qual**, v. 29, p. 826-834, 2000.

PETROVICÈ M.; ELJARRAT, E.; ALDA, J.L.; BARCELO, È. D. Analysis and environmental levels of endocrinedisrupting compounds in freshwater sediments. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, no. 11, p. 234-245, 2001

PEURAVUORI, J.; KOIVIKKO, R.; PIHLAJA, K. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. **Water Research**, v. 36: p. 4552 – 4562, 2002.

PEURAVUORI, J.; PIHLAJA, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. **Analytica Chymica Acta**, v. 337: p. 133-149, 1997.

PHILIP JR. A. **Saneamento, Saúde e Meio Ambiente - Fundamentos para um Desenvolvimento Sustentável**, Editora Manole, p.145-127, São Paulo, 2005

PONEZI, DUARTE E CLAUDINO. Fármacos em Matrizes Ambientais- Revisão. **Centro Pluridisciplinar em Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas**, Universidade estadual de Campina, 2006.

PONS, M.; BONTÉ, S. L.; POTIER, O. Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterization. *Journal of Biotechnology*, v. 113, p. 211-230, 2004.

PORTO, M. F. Bacias Críticas: **Bases Técnicas para a definição de Metas Progressivas para seu Enquadramento e a Integração com os demais Instrumentos de Gestão**. Curitiba: UFPR – Departamento de Hidráulica e Saneamento, 2007. (FINEP/ CT-HIDRO). Projeto concluído.

PREZIOSI, P. Endocrine disrupters as environmental signallers: an introduction. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v.70, p.1617 –1631, 1998.

PRZYBYSZ, B.C.L. **A Gestão de Recursos Hídricos sob a ótica do Usuário de Saneamento: Estudo de Caso da Bacia do Alto Iguaçu**. 237f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) Departamento de Hidráulica e Saneamento – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. J.; ENO, N. C.; TYLER, C. Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works R.; Sumpter, J. P. *Chem. Ecology*, v. 8, p. 275-285, 1994.

RAIMUNDO, C. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 126f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Setembro, 2007.

RAMAN D.R.; WILLIAMS E.; LAYTON A.C.; BURNS R.; EASTER J.P.; DAUGHERTY A.; MULLEN M.; SAYLER G. Estrogen Content of Dairy and Swine Wastes. *Environmental Science Technology*, v 38, p. 3567-3573, 2004.

RIBANI M.; BOTTOLI C.B.G.; COLLINS C.H.; JARDIM I.C.S.F.; MELO L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

ROBINSON, B.; HUI, J.P.; SOO, E.; HELLOU, J. Estrogenic compounds in seawater and sediment from halifax harbour, Nova Scotia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, p. 18–25, 2009.

ROSEN, J.; DAY, A.; JONES, T.K.; JONES; E. T.T.; NADZAN, A.M.AND STEIN, R.B., *Journal of Medicinal Chemistry*, v 38, n. 25, p. 4855-4874, 1995.

ROSTAN, J. C.; CELLOT, B. On the use of UV spectroscopy to assess dissolved organic carbon origin variations in the upper Rhône River. *Aquatic Sciences*, v. 57, n. 1, p. 70-80, 1995.

SCHÄFER, A. I.; NGHIEM, L. D.; WAITE, T. D. Removal of natural hormone Estrone from aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis. *Environmental Science and Technology*, v. 37, n. 1, p. 182-188, 2003.

SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals”. Part II. “The fluorescence spectroscopy approach. *Anal. Chim. Acta*, v. 232, p. 77-106, 1990.

SENESI, N.; MIANO T. M.; PROVENZANO, M. R.; BRUNETTI, G. Spectroscopy and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origins. **The Science of the Total Environment**, v. 81/82, p. 143-156, 1989.

SERVOS, M. R.; BENNIE, D. T.; BURNISON B. K.; JORKOVIC, A.; MCINNIS, R.; NEHELI, T.; SCHNELL, A.; SETO, P.; SMYTH, S. A; TERNES, T. A. **Science of the Total Environment**, v.336, p.155-170, 2005.

SHAPPELL, N.; VRABEL, M.; MADSEN, P.; HARRINGTON, G.; LARSEN, G.; BEACH, E.; HORWITZ, C; HUNT, P. AND COLLINS, T. Destruction of strogens Using Fe-TAML/Peroxide Catalysis, **Environmental. Science Technology**, v. 42, p.1296–1300, 2008.

SIAH, A.; PELLERIN, J.; AMIARD, J.C.; PELLETIER, E. AND VIGLINO, L. Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 135, p.145–156, 2003.

SIMMONDS, R.J. **Chemistry of biomolecules: An introduction**, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1992.

STUMPF, M.; TERNES, T.A.; WILKEN, R.-D.; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN, W. Polar Drugs Residues in Sewage and Natural Waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Science. Total Environmental**, v.. 225, p.135-14, 1999.

SUDERHSA – Superintendência de Desenvolvimento de Recursos Hídricos, Saneamento e Ambiental. **Plano de Despoluição Hídrica da Bacia do Alto Iguaçu**. Programa de Saneamento Ambiental da Região Metropolitana de Curitiba – Relatórios Finais. Curitiba: SUDERHSA, 2000. Projeto concluído.

SWARTZ, M e KRULL, I.S. **Analytical method development and validation**. Editora Marcel Dekker INC, New York, 1997.

TAKESHI, O.; YOSHITATSU, H.A.; HIRONORI, A.; MASATOSHI, B.; HIROSHI, U.; e AKIHISA U. Year-to-year differences in plasma levels of steroid hormones in pre-spawning chum salmon. **General and Comparative Endocrinology**, 133, p. 199–215, April, 2003.

TANAKA, T.; TAMURA, T.; ISHIZAKI, Y.; KAWASAKI, A.; KAWASW, T.; TERAGUCHI, M.; TANIGUCHI, M. Enzymatic treatment of estrogens and estrogen glucuronide. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 731–735, 2009.

TERNES T.A.; STUMPF M.; MUELLER J.; HABERER K.; WILKEN R. D.; SERVOS M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants } I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment** , v. 225, p.81-90, 1999.

TERNES, T.A.; ANDERSEN, H.; GILBERG, D.; BONERZ, M. Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. **Analitical Chemistry**, v. 74, p. 3498–3504, 2002.

THOMAS, K.; BALAAM, J.;HURST, M.; NEDYALKOVA, Z.; MEKENYAN, O. Potency And Characterization Of Estrogen-Receptor Agonists In United Kingdom Estuarine Sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.. 23, p. 471–479, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v.74, n.5, 835-855, 2002.

TRAINOR B.C.; KYOMEN H.; MARLER C. A. Estrogenic encounters: How interactions between aromatase and the environment modulate aggression, **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 27, p. 170–179, January, 2006.

USFDA - United States, Food and Drug Administration; Guidance for Industry, **Analytical Procedures and Methods Validation**, 2001.

VENDRAME, R. **Estudo das Relações entre Estrutura-Atividade de Progestagênicos Contraceptivos, através da utilização de Parâmetros Físico-Químicos calculados e métodos de Reconhecimento de Padrão**. 402f Tese (Doutorado em Ciência na Área Físico-Química). Instituto de Química-Universidade de Campinas, São Paulo, 1998.

VOGT, A. I.; GOLDSCHMIDT JUNIOR, J. L.; GODOY, L. P.; BADKE, M. R. T. Uso de indicadores ambientais no monitoramento da qualidade do efluente final em uma estação de tratamento de esgotos. AEPRO – Associação Brasileira de Engenharia de Produção. **Revista Engenharia de Produção**, artigo nº 204, 1998.

WEN Y.; ZHOU B.S.; XU Y.; JIN S.W.; FENG Y.Q. Analysis of estrogens in environmental waters using polymer monolith in-polyether ether ketone tube solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1133, p. 21–28, 2006.

WESTERHOFF, P.; ANNING, D. Concentrations and characteristics of organic carbon in surface water in Arizona: influence of urbanization. **Journal of hydrology**, v. 236, p. 202-222, 2000.

WIJAYAGUNAWARDANE M.P.B; MIYAMOTO A. E SATO K. Prostaglandin E2, Prostaglandin F2a and Endothelin-1 Production by cow Oviductal Epithelial Cell Monolayers: Effect of Progesterone, Estradiol 17 β , Oxytocin and Luteinizing Hormone. **Theriogenology**, v. 52, p.791-801, 1999.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 18, p. 624-632, 1999.

WU, F.C.; KOTHAWALA, D.N.; EVANS, R.D.; DILLON, P.J. E CAI, Y.R. Relationships between DOC concentration, molecular size and fluorescence properties of DOM in a stream. **Applied Geochemistry**, v. 22, p. 1659-1667, 2007.

YAKABE C.; HONDA A.M.; MAGALHÃES J.F. Determinação do 17 β -estradiol nas formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, jul./set., 2005.

YAMAMOTO, A.; YAKAKUTANI A.; YAMAMOTO K.; ZUKAMIURA T.; KAZUMIYAKODA K. Steroid Hormone Profiles of Urban and Tidal Rivers Using LC/MS/MS Equipped with Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Photoionization Sources. **Environmental Science Technology**, v. 40, p.4132-4137, 2006.

YING, G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v.28, p.545-551, 2002.

YOSHIMOTO, T.; NAGAI, F.; FUJIMOTO, J.; WATANABE, K.; MIZUKOSHI, H.; MAKINO, T.; KIMURA, K.; SAINO, H.; SAWADA, H.; OMURA, H. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolated from activated sludge in wastewater treatment plants. **Appl. Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5283-5289, 2004.

ZHANG, X.; LI, Q.; LI G.; WANG, Z.; YAN C. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 1210–1216, 2009.

ZHENG W.; YATES S.R. e BRADFORD S.A. Analysis of Steroid Hormones in a Typical Dairy Waste Disposal System. **Environmental. Science. Technology**. **V.42**, p.530–535, 2008.

ZHOU Y.; WANG Z.; JIA N. Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 α -ethinylestradiol with BSTF or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination. **Journal of Environmental Sciences**, v.19, p. 879–884, 2007.